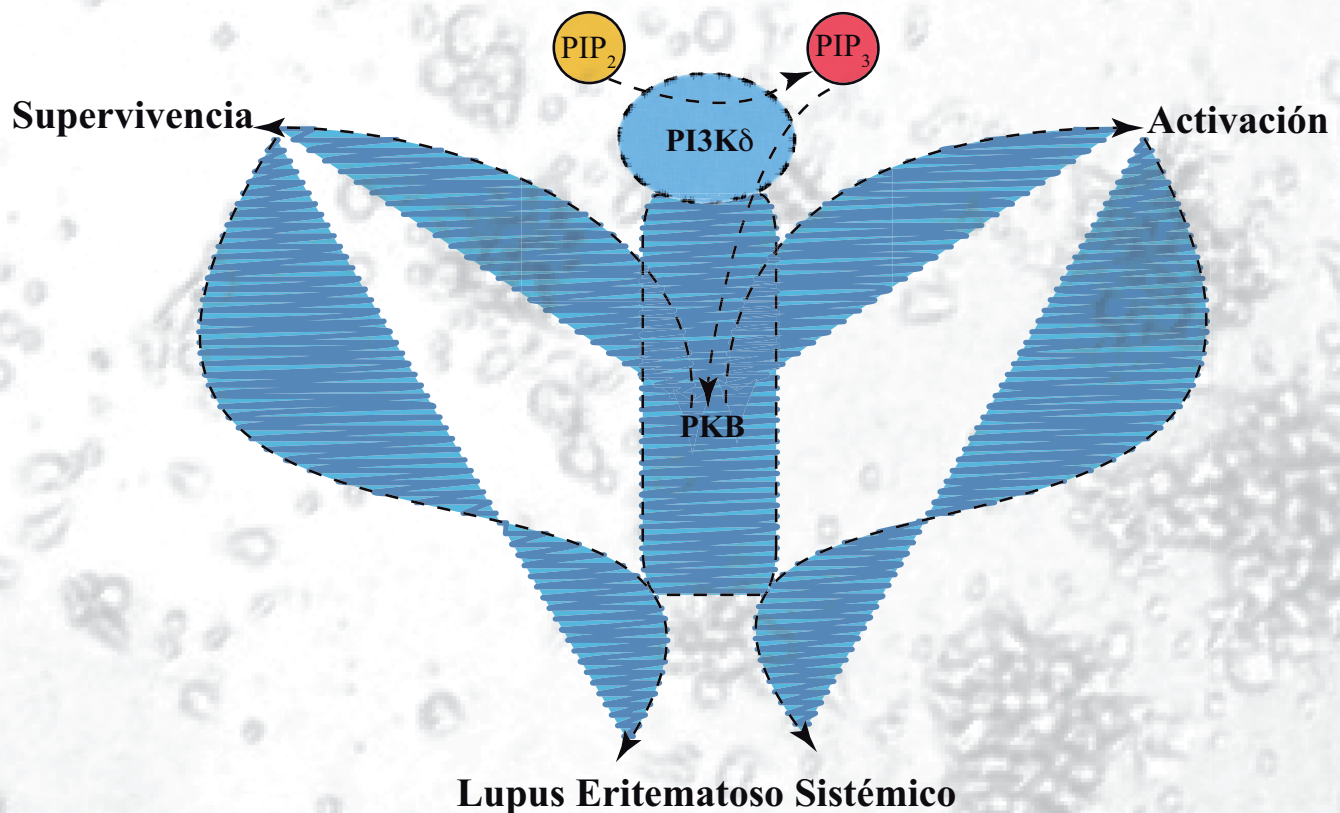


**Programa de Doctorado del Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**Estudio sobre el papel de PI3K
en la enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico Humano
y su posible aplicación terapéutica.**



**Doctorando: Abel Suárez Fueyo
Directora: Ana Clara Carrera Ramírez
Codirector: Domingo F. Barber Castaño
Departamento de Inmunología y Oncología
Centro Nacional de Biotecnología**



A mi familia

A Paula

Theodore Roosevelt: Far and away the best prize that life has to offer is the chance to work hard at work worth doing.

Carl Sagan: Not explaining science seems to me perverse. When you're in love, you want to tell the world.

Índice

SUMMARY	15
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	27
◆ El sistema inmunológico (SI)	29
◆ La tolerancia inmunológica	30
◆ ¿Que es la tolerancia inmunológica? Clasificación	30
◆ Ignorancia inmunológica	31
◆ Anergia clonal	31
◆ Supresión inmunológica	31
◆ Apoptosis	32
- Apoptosis autónoma de las células activadas (ACAD)	32
- Apoptosis inducida por activación (AICD)	32
◆ Enfermedades autoinmunes	34
◆ ¿Que son?	34
◆ Clasificación de las enfermedades autoinmunes	34
◆ Enfermedades autoinmunes órgano-específicas	34
◆ Enfermedades autoinmunes sistémicas	34
◆ Lupus Eritematoso Sistémico (LES)	34
◆ ¿Que es el LES? Diagnóstico y clasificación	34
◆ Tratamiento	35
◆ Prevalencia y factores de la enfermedad	36
◆ Alteración de los mecanismos de tolerancia en el LES: patología celular y molecular	37
◆ Fosfatidilinositol 3 quinasa	40
◆ ¿Que son las PI3K?	40
◆ Clases de PI3K	41

◆ Clase I de PI3K	41
◆ Familia de las PI3K de clase I	41
◆ Subclases de la clase I de PI3K	43
◆ Subclase I _A de PI3K	43
◆ Subclase I _B de PI3K	44
◆ La clase I de PI3K en el sistema inmunológico	45
◆ Funciones de las isoformas p110δ y p110γ de la clase I de PI3K en las principales células del sistema inmunológico relacionadas con el LES.	46
◆ Macrófagos	46
◆ Neutrófilos	46
◆ Mastocitos	46
◆ Células natural killer	46
◆ Células dendríticas	47
◆ Células B	47
◆ Células T	47
◆ La clase I de PI3K y la enfermedad LES en ratón	49
◆ PI3K como diana terapéutica en modelos de LES en ratón	50
◆ Presentación del trabajo	51

OBJETIVOS 53

MATERIALES Y MÉTODOS 57

◆ Obtención de muestras	59
◆ Western Blot	59
◆ Inmunoprecipitación y ensayo quinasa	59
◆ Inmunofluorescencia	60
◆ Citometría de flujo	61
◆ Plásmidos, transfección y electroporación	61
◆ Ensayo de anergia	61
◆ Ensayos de ACAD y AICD	62
◆ Estadística	63

RESULTADOS	65
◆ Población de estudio	67
◆ Determinación del estado de PI3K en células de sangre periférica de individuos con LES	68
◆ Análisis de los niveles de fosforilación de PKB en células de sangre periférica de individuos con LES	68
◆ La vía de PI3K/PKB se encuentra activa tanto en células T CD4 ⁺ de memoria como en las células T CD4 ⁺ naïve de individuos con LES en fase activa	70
◆ Análisis de los niveles del principal regulador negativo de la ruta PI3K/PKB	71
◆ Análisis de los niveles de fosforilación de PKB en PBMCs de individuos con artritis reumatoide	72
◆ Determinación de la isoforma “hematopoyética” responsable de la actividad PI3K en células de sangre periférica de individuos con Lupus Eritematoso Sistémico	73
◆ La actividad de PI3K en PBMCs de individuos con LES es debida a la isoforma catalítica p110δ	73
◆ La actividad de PI3K en células T de individuos con LES es debida a la isoforma catalítica p110δ	74
◆ Análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica de pacientes con LES y determinación de posibles relaciones con la activación de PI3K	76
◆ Alteración de la relación CD4/CD8 en individuos con LES	76
◆ Los individuos con LES presentan un mayor porcentaje de células T con fenotipo de memoria que los individuos sanos	77
◆ Existe una correlación positiva entre la relación de células T CD4 de memoria/naïve y los niveles de pPKB en pacientes en fase activa de la enfermedad	79
◆ Análisis de los mecanismos de tolerancia periférica en células T de sangre periférica de pacientes con LES	80
◆ El mecanismo de anergia no esta alterado, bajo nuestras condiciones experimentales, en nuestra población	80
◆ El mecanismo de la apoptosis inducida por activación esta alterado en las células T de pacientes con LES	81

◆ Determinación de posibles relaciones de la actividad PI3K y la resistencia al mecanismo de AICD en las células T de pacientes con LES	82
◆ La actividad de PI3K tiene relación con la apoptosis en células Jurkat	82
◆ La inhibición de p110δ recupera el defecto en AICD de las células T de individuos con LES	84
DISCUSIÓN	87
◆ Clasificación de los pacientes	89
◆ La vía de PI3K/PKB se encuentra activa en las PBMCs, y en concreto en los linfocitos T de individuos con LES, mostrando una mayor actividad de la subunidad p110δ	90
◆ La vía de PI3K/PKB está relacionada con la subpoblación de células de T de memoria en pacientes con LES	91
◆ La activación de la vía de PI3K (p110δ) explica la resistencia de las células T de los pacientes con LES al mecanismo de tolerancia periférica de AICD.	93
◆ Posibles mecanismos de activación de PI3Kδ en células T de la sangre periférica y PBMCs en pacientes con LES	95
◆ Posibilidades terapéuticas de la inhibición de p110δ en la enfermedad del LES	96
◆ ¿ Tiene p110γ importancia terapéutica en la enfermedad de LES en humanos?	98
CONCLUSIONES	101
REFERENCIAS	105
ANEXO	119
◆ Tabla de SLEDAI	121
◆ Artículo: Enhanced phosphoinositide 3-kinase δ activity is a frequent event in systemic lupus erythematosus that confers resistance to activation-induced T cell death	125
◆ Agradecimientos	137



Summary



Summary:

Insufficient cell death of activated T cell results in autoimmune disease. Two pathways control homeostasis of activated T cells; the main mechanism, ACAD (activated T cell autonomous death), controls the size of the T cell compartment by deleting T cells when the inflammatory cytokine environment disappears. Autoreactive T lymphocytes are eliminated by restimulation via the T cell receptor and undergo AICD (activation-induced cell death). Whereas failure of ACAD leads to lymphoma, AICD alterations lead to autoimmune disorders.

Class I PI3K (phosphoinositide-3-kinases) trigger formation of 3-poly-phosphoinositide, which act as second messengers. PKB/AKT, the principal PI3K effectors, controls several T cell responses including growth, proliferation, protein synthesis, migration and survival.

Genetically-induced alterations in at different points of the PI3K/PKB pathway lead to development of a lupus-like disease in mice, which develop autoimmune renal failure with increased numbers of memory T lymphocytes and reduced apoptosis.

We studied the PI3K pathway in human systemic lupus erythematosus (SLE), an autoimmune disease caused by autoreactive T and B cells. We show that this pathway is frequently activated in human SLE patient peripheral blood mononuclear cells and T cells, more markedly in active disease phases. Enhanced activation of the PI3K δ isoform in SLE peripheral blood T cells paralleled accumulation of activated/memory T cells, which showed reduced AICD. This AICD defect in SLE T cells was corrected by reduction of PI3K δ activity.

In conclusion, PI3K δ contributes to induction of enhanced SLE memory T cell survival, supporting its potential as a novel therapeutic approach for SLE treatment.

Abreviaturas



Abreviaturas:

ACAD	Apoptosis autónoma de células activadas	Activated cell autonomous death
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
AICD	Apoptosis inducida por activación	Activation-induced cell death
AP	Activador de proteína	Activator protein
April	Un ligando inductor de proliferación	A proliferation inducing ligand
ARN	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
ATP	Adenosina 5' trifosfato	Adenosine 5' triphosphate
BAFF	Factor activador de células B perteneciente a la familia de los TNF	B cell activating factor belonging to the TNF family
BAK	Antagonista asesino homólogo de BCL-2	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAX	Proteína X asociada a BCL-2	BCL-2-associated X protein
BCL	Linfoma de células B	B cell lymphoma
BCR	Receptor de células B	B cell receptor
BIM	Mediador de muerte celular por interacción con BCL-2	BCL-2 interacting mediator cell death
BLyS	Estimulador de linfocitos B	B lymphocyte stimulator
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine serum albumine
cADN	ADN complementario	Complementary DNA
Cbl-b	Casitas del linaje de linfoma B	Casitas B-cell lymphoma B
CCR	Receptor de quimioquinas (C-C)	Chemokine (C-C motif) receptor
CD	Grupo de diferenciación	Cluster of differentiation

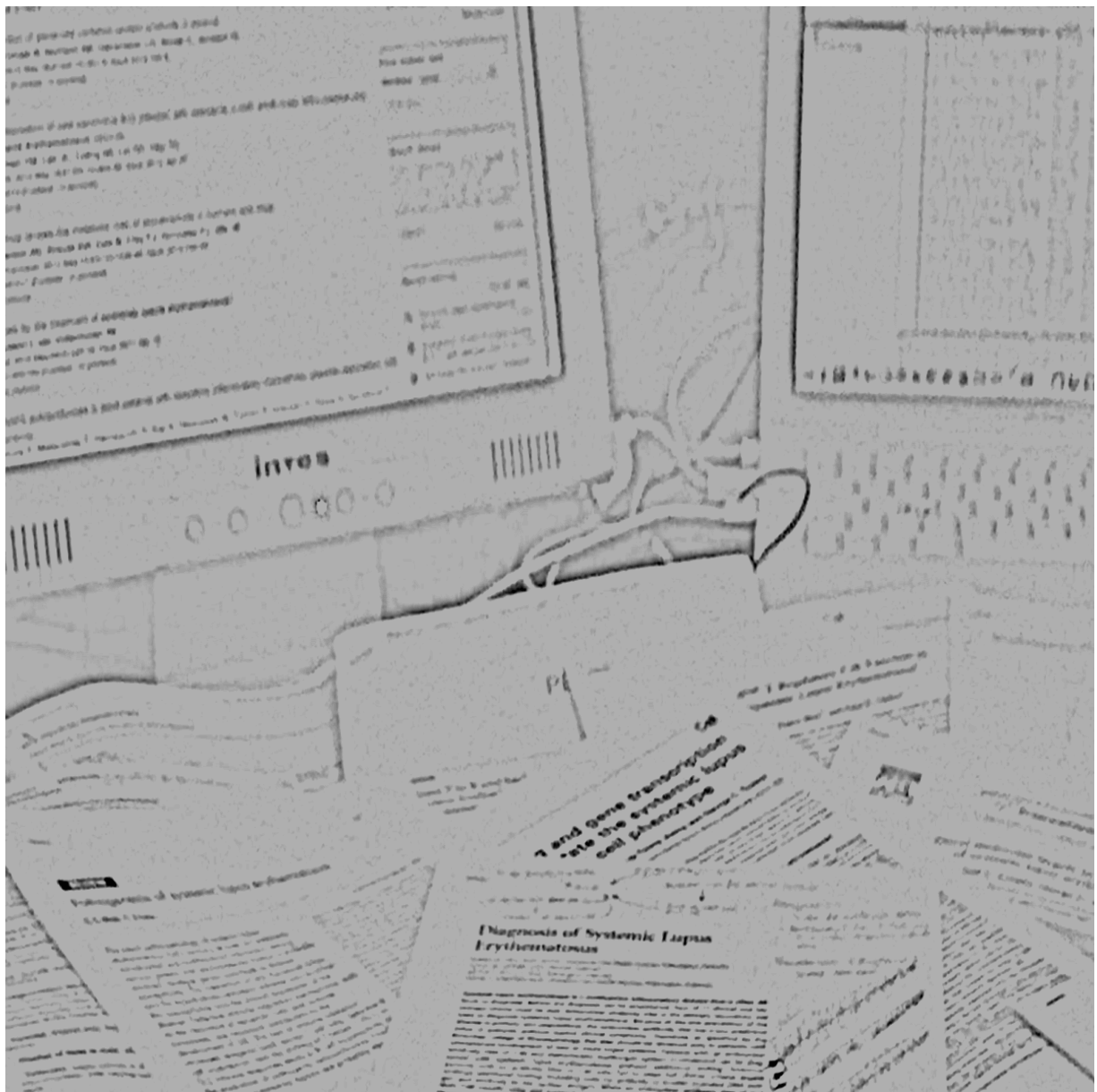
CIP	Proteína inhibidora de ciclinas	Cyclin inhibitor protein
COX	Ciclo-oxigenasa	Cyclooxygenase
CTLA	Antígeno de linfocitos T citotóxicos	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
CXCR	Receptor de quimioquinas CXC	C-X-C chemokine receptor
DGK	Diacylglicerol quinasa	Dyacylglycerol kinase
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte	Death-inducing signaling complex
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido	Dimethyl sulfoxide
DTT	Ditiotreitol	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético	Ethylenediaminetetraacetic acid
Egr	Gen de respuesta temprana de crecimiento	Early growth response protein
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas	Fas-associated Death domain
FasL	Ligando de Fas	Fas ligand
FeR	Receptor del fragmento constante	Fragment constant receptor
FCS	Suero fetal de ternera	Fetal calf serum
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Fluorescein isothiocyanate
Fig.	Figura	Figure
FLIP	Proteína inhibidora de FLICE	FLICE inhibitory protein
gag-PKB	Glicosaminoglicano-PKB	Glycosaminoglycan-PKB
GEF	Factor cambiador de guanosinas	Guanosine exchange factor
GFP	Proteína verde fluorescente	Green fluorescent protein
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR	Receptor asociado a proteína G	G proteing coupled receptor
GRAIL	Gen relacionado con anergia en linfocitos	Gene related to anergy in lymphocytes
GSK	Glicógeno sintasa quinasa	Glycogen synthase kinase
HEPES	Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-pireracilil-etanosulfónico	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPK	Quinasa de progenitores hematopoyéticos	Hematopoietic progenitor kinase
HRP	Peroxidasa de rábano	Horseradish peroxidase
IFN	Interferón	Interferon
IL	Interleuquina	Interleukine
IP	Inmunoprecipitación	Immunprecipitation
KD	Quinasa inactiva	Kinase dead
KO	Knock out	Knock out
LAT	Enganche para la activación de células T	Linker for activation of T cells
LES	Lupus eritematoso sistémico (LES)	Systemic Lupus Erythematosus (SLE)
LT	Leucotrieno	Leukotriene
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos	Mitogen-activated protein kinases
mARN	ARN mensajero	Messenger RNA
Mcl	Leucemia de célula mieloide	Myeloid cell leukemia
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	Major histocompatibility complex
Mip	Proteína inflamatoria de macrófagos.	Macrophage inflammatory protein
mPKB	PKB miristolado	Myristoylated PKB
mTORC	Sustrato de rapamicina en mamíferos	Mammalian target of rapamycin
NFAT	Factor nuclear de las células T activadas	Nuclear factor of activated T cells
NFκB	Factor nuclear κB	Nuclear factor κB
NK	Asesina natural	Natural killer
NSAID	Fármaco antiinflamatorio no esteroideo	Non steroid anti-immflamatory drug
pPKB	Fosfo-PKB	Phospho-PKB
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Tampón fosfato	Phosphate buffered saline

PCy5	Ficoeritrina-fiocianina	Phycoerythrin-coupled cyanin
PDK	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos	Phosphoinositide-dependent kinase
PE	Ficoeritrina	Phycoerythrin
PH	Dominio homólogo a Pleckstrina	Pleckstrin homology domain
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK	Proteína inhibidora de quinasa	Protein inhibitory of kinase
PIKAP	Proteína adaptadora de PI3K	PI3K adaptor protein
PIP	Fosfatidilinositol fosfato	Phosphatidylinositol phosphate
PIP ₂	Fosfatidilinositol (4,5) difosfato	Phosphatidylinositol (4,5)-disphosphate
PIP ₃	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Proteína quinasa B	Protein kinase B
PKC	Proteína quinasa C	Protein kinase C
PLC	Fosfolipasa C	Phospholipase C
PMSF	Fluoruro de para-metilsulfato	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTEN	Fosfatasa y homóloga de tensina	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	Modulador de apoptosis por regulación de p53	P53-upregulated modulator of apoptosis
PX	Homólogo de Phox	Phox homology
RasGRP1	Proteína 1 de liberación de guanil en Ras	Ras guanyl-releasing protein 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
rpm	Revoluciones por minuto	Revolutions per minute
SEM	Error estándar de la media	Standard error of mean
Ser	Serina	Serine
SH	Homólogo de Src	Src homology
SHIP	Fosfatasa de la posición 5 del anillo inositol que contiene un dominio SH2	SH2 domain containing inositol-5-phosphatase

SI	Sistema inmunológico	Immune system
SLAM	Molécula de señalización activadora en linfocitos	Signaling lymphocyte-activation molecule
SLEDAI	Índice de actividad de la enfermedad del LES	SLE disease activity index
TCR	Receptor de células T	T cell receptor
TGF	Factor de crecimiento tumoral	Tumor growth factor
Th	T ayudantes	T helper
Thr	Treonina	Threonine
TNF	Factor de necrosis tumoral	Tumor necrosis factor
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tregs	T reguladoras	regulatory T
Tyr	Tirosina	Tyrosine
VLA	Antígeno de activación muy tardía	Very late activation antigen
\bar{X}	Media	Mean
Zap70	Proteína quinasa 70 asociada a la cadena Zeta	Zeta-chain-associated protein kinase 70

Introducción



Introducción:

El Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico (SI) es un conjunto de elementos químicos y celulares que tiene como principal objetivo la defensa del organismo frente a los distintos patógenos existentes (bacterias, virus, parásitos y hongos). Desde un punto de vista clásico, se habla de dos tipos de respuestas inmunológicas: la **inmunidad innata**, aquella llevada a cabo por monocitos, macrófagos, células NK (del inglés *natural killer*), células dendríticas y granulocitos; y la **inmunidad adaptativa** constituida por las células T y las células B (Murphy et al., 2008; **Fig.1**).

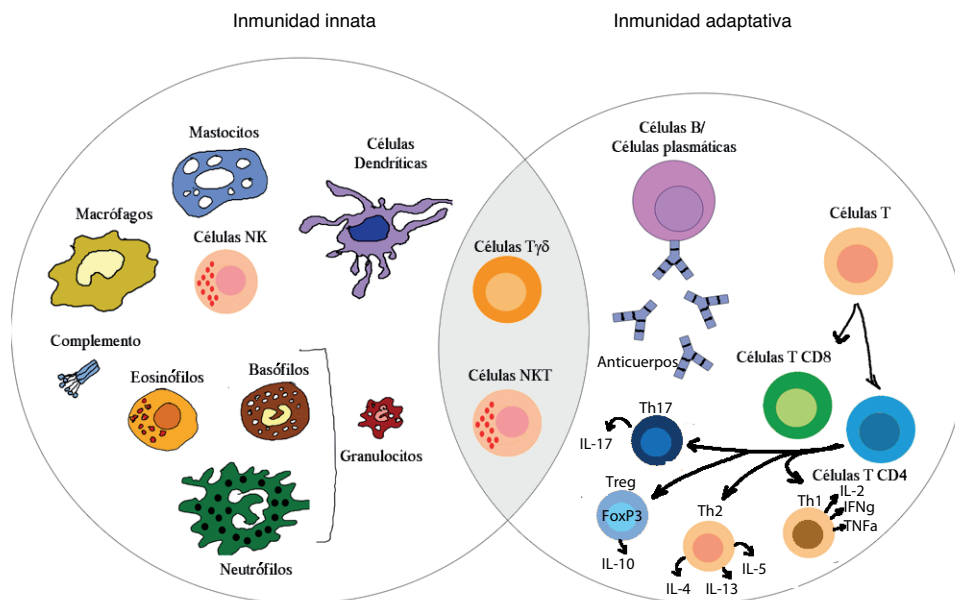


Figura 1. Componentes de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa.
(Adaptado de Dranoff, 2004)

Además de la defensa frente a patógenos externos, el SI tiene una función de limpieza. Todas las células del cuerpo humano están sometidas a una estricta regulación, de tal manera que si acumulan fallos y/o alteran su función normal, son eliminadas, bien sea por necrosis (mecanismo pasivo asociado a un proceso catabólico) o bien por apoptosis (proceso activo asociado a un proceso metabólico) (Farber et al., 1994; Kanduc et al., 2002). En ambos casos se generan restos celulares que en condiciones normales son captados, procesados y eliminados por los macrófagos. Este sería un primer mecanismo para evitar la activación de las células B y T por estos antígenos propios, pero además existen otra serie de mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos a las diferentes células del SI que persiguen la misma función. Al conjunto de estos mecanismos se les denomina tolerancia inmunológica.

La tolerancia inmunológica

¿Que es la tolerancia inmunológica? Clasificación.

Bajo este término se engloban los diferentes mecanismos destinados a impedir que las células del SI respondan frente a los antígenos propios y generen una respuesta inmunológica. Se clasifican en dos grandes grupos (Janeway y Flavell, 1999; Fig.2).

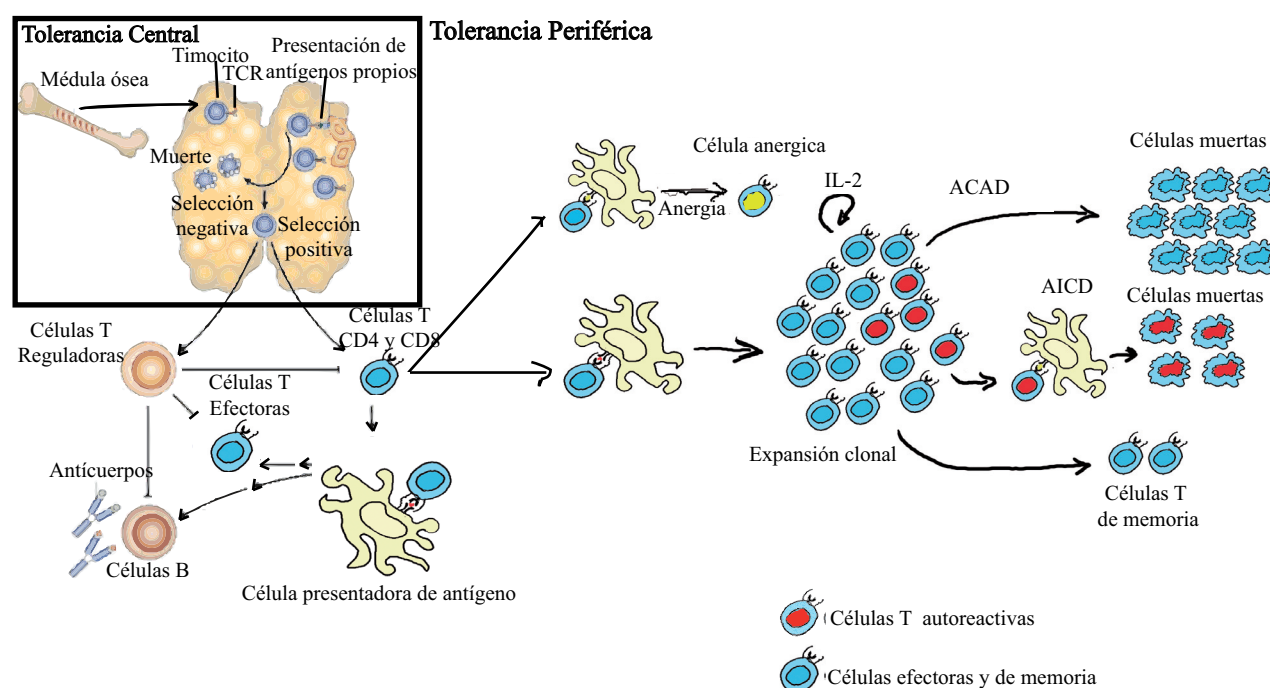


Figura 2. Esquema de los procesos de la tolerancia central y periférica. (Adaptado de Gregersen y Behrens, 2006)

Las células del sistema inmunológico adaptativo, tanto las B como las T, son sometidas a diversos mecanismos de control que aseguran la “no respuesta” frente a antígenos propios. Durante su generación, estas células se ven sometidas a un primer proceso de tolerancia central en el que las células que responden frente a antígenos propios son eliminadas por apoptosis (delección clonal). Una vez en periferia existen diferentes mecanismos de control como la anergia, el AICD (otro proceso de delección clonal), el ACAD o las funciones inmunoregulatoras que realizan unas células sobre otras ya sea mediante la interacción de moléculas de membrana o por la generación de citoquinas, como es el caso de las células T reguladoras que modulan las respuestas mediante ambos mecanismos (supresión clonal). Todos estos mecanismos se engloban dentro de lo que se denomina tolerancia periférica.

La **tolerancia central**: aquella que tiene lugar en los órganos linfoides primarios durante el desarrollo de las células, el timo en el caso de las células T y la médula ósea en el caso de las células B (o el hígado en el feto). En este proceso, que incluye varias fases de selección negativas y positivas y un proceso de reordenamiento génico para dar lugar a los receptores que van a reconocer a los antígenos, se eliminan la mayor parte de las células T y B que responden frente a antígenos propios. No obstante se sabe que ciertas células autorreactivas son capaces de superar este proceso de selección (Shlomchik et al., 2002). Para controlar a las células que han superado esta selección existen otros mecanismos englobados dentro de la denominada tolerancia periférica.

La **tolerancia periférica**: engloba distintos mecanismos, destinados a controlar a las células que han escapado o superado la tolerancia central. Dentro de estos mecanismos cabe destacar:

Ignorancia inmunológica: se trata de una forma pasiva de tolerancia en la que la célula nunca entra en contacto con el antígeno que reconoce. Esto puede ocurrir por la existencia de barreras físicas, como es el caso de la barrera hematoencefálica, o bien porque el antígeno está en concentraciones demasiado bajas como para poder generar una respuesta inmunológica (Wekerle, 2006).

Anergia clonal: descrita en células B (Goodnow et al., 1991; Goodnow, 1996; Duty et al., 2009) y células T (Wells et al., 2009). Es un mecanismo intracelular que permite que, aunque estos linfocitos permanecen vivos, no sean capaces de inducir una respuesta inmune eficiente (salvo en determinadas condiciones *in vitro* donde este estado se puede revertir). En referencia a las células T, que se estudiarán en la presente tesis doctoral, este mecanismo es inducido por la estimulación del TCR en ausencia de moléculas coestimuladoras positivas, quedando la célula en un estado de no respuesta cuyo efecto más característico *in vitro* es la no proliferación tras una segunda estimulación (Schwartz et al., 2003). La activación del TCR, que reconoce moléculas presentadas por los complejos MHC I o MHC II, es óptima cuando a la vez se activan en la célula T moléculas coestimuladoras, de las cuales la más importante es CD28. La activación de CD28 a través de sus ligandos B7.1 o B7.2 promueve la síntesis y secreción de citoquinas, especialmente de IL-2, y de señales de supervivencia y proliferación (Okkenhaug et al., 2004). La ausencia de esta coestimulación conlleva una descompensación del flujo de calcio que se establece tras la estimulación del TCR, haciéndose este mayor, en referencia a otras vías como la de las MAPK inducidas por Ras, cuya señal se ve reducida en este sistema (Li et al., 1996; Fields et al., 1996). Esto lleva a un desequilibrio entre los factores de transcripción NFAT y AP-1, favoreciéndose el primero, y a la alteración del patrón de transcripción de genes con respecto a una activación normal (Macian et al., 2002). Dentro de la regulación de este complejo sistema van a cobrar relevancia ciertas proteínas como la DGK (del inglés *diacylglycerol kinase*), cuya expresión se incrementa en las células T en las que se induce anergia (Macian et al., 2002). La actividad de esta proteína va a transformar el lípido diacilglicerol en ácido fosfatídico, impidiendo de esta manera el reclutamiento de RasGRP1 (del inglés *Ras guanyl releasing protein 1*) a la membrana y la posterior activación de Ras por este GEF (del inglés *guanosine exchange factor*), que es el principal de Ras en esta vía (Topham y Prescott, 2001). Otras de las proteínas que incrementan su expresión en las células anérgicas son los factores de transcripción Egr2 y Egr3 (del inglés *early growth response gene 2 y 3*), los cuales podrían estar implicados en la sobreexpresión de DGK y de Cbl-b (del inglés *Casitas B-cell lymphoma-B*; Zheng et al., 2008). Cbl-b es una proteína de la familia de las ubiquitina ligasas E3 junto con GRAIL (del inglés *gene related to anergy in lymphocytes*), NEDD4 (del inglés *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*) e Itch. Estas proteínas modifican a otras mediante la adición de ubiquitinas, marcándolas así para que sean degradadas por el proteosoma y van a jugar un importante papel en el establecimiento de la anergia degradando algunas proteínas importantes en la activación celular como son, entre otras, PI3K, PKC θ y PLC γ (Mueller et al., 2004).

Supresión inmunológica: la liberación de citoquinas por determinadas células y/o la interacción de determinadas moléculas de membrana van a dar lugar a la supresión y/o activación de otras células. Dentro de este sistema juegan un papel relevante los diferentes tipos de células T helper (Th), células

CD4 maduras que se han activado y diferenciado a su vez en un ambiente de citoquinas determinado (Zhu y Paul, 2010). De esta manera las citoquinas liberadas por las células Th1 como la IL-2 favorecen la respuesta de las células T CD8⁺ (Vesosky et al., 2006), mientras que el IFN γ da lugar a la inhibición de la proliferación de las células Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) y viceversa (Bashyam., 2006), pero al mismo tiempo el IFN γ activa a macrófagos (Zhu y Paul, 2010). A su vez las citoquinas liberadas por estas células Th2 da lugar a la correcta función de las células B y al reclutamiento de eosinófilos para la eliminación de patógenos extracelulares (Romagnani., 1991; Zhu y Paul, 2010). La citoquina liberada por las células Th3 (TGF β), un subtipo de células T reguladoras, va a inhibir la respuesta Th1, la proliferación de las células B y va a controlar la función de las células NK y macrófagos. Además, las células T reguladoras clásicas (Tregs) generan IL-10 que también inhibe las respuestas Th1 y Th2 (Braga et al., 2011). Otro subtipo de células CD4 helper, que actualmente está cobrando gran importancia por su relación con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, son las Th17. Estas células, que generan y secretan IL-17, favorecen la acción y quimiotaxis de los neutrófilos así como la supervivencia de las células B y la producción de anticuerpos por estas células (Aujla y Alcorn, 2011; Shin et al., 2011). Adicionalmente a la modificación por citoquinas, las células, especialmente las Tregs, van a presentar moléculas de membrana como CTLA-4, CD40L, CD28, etc. que al entrar en contacto con su ligando, generalmente expresado en otra célula, van a dar lugar a la modulación de la actividad o de alguna de las funciones de las células que expresan estas moléculas (Alderson et al., 1994; Parry et al., 2005).

Apoptosis: Se trata de la muerte de las células B y T que debe tener lugar tras la expansión clonal generada por la respuesta inmunológica. Dentro de este mecanismo se diferencian dos procesos:

1. Apoptosis autónoma de las células activadas (ACAD, del inglés *Activated Cell Autonomus Death*): se trata del principal mecanismo encargado de reducir el número de células T-tras la expansión clonal que sucede en la respuesta inmunológica. Ocurre cuando las células activadas se encuentran en un ambiente en el que ya no hay las señales de supervivencia adecuadas o necesarias. Este mecanismo también es conocido como muerte por privación de citoquinas (Krammer et al., 2007). En este mecanismo tienen especial importancia las moléculas Bim (del inglés BCL-2-interacting mediator of cell death) y PUMA (P53-upregulated modulator of apoptosis). Estas proteínas aumentan su expresión en las células activadas, cuando éstas están en un ambiente sin las citoquinas adecuadas; Bim y PUMA van a interaccionar en la membrana de la mitocondria con las moléculas BCL-2 o BCL-XL, esto impide la inhibición de BAX o BAK que provocan la liberación del citocromo c y por último la muerte de la célula T (Krammer et al., 2007).

2. Apoptosis inducida por activación (AICD, del inglés *Activation-Induced Cell Death*): descrita en células B y T activadas, se trata de un mecanismo en el que intervienen varias rutas dependientes e independientes de caspasas. Da lugar a la muerte de las células activadas que responden a antígenos de manera específica en ausencia de un ambiente coestimulador apropiado (Krammer et al., 2007). En células T, que son el objeto de estudio de esta tesis doctoral, tras la primera estimulación vía TCR en un contexto de coestimulación apropiado y completo va a tener lugar la expansión clonal.

En la primera etapa de esta expansión las células T, éstas no van a ser sensibles a la apoptosis por re-estimulación (AICD). Esto se debe, por una parte a que la activación completa de la célula T va a dar lugar, entre otras rutas, a la activación del factor de transcripción NFκB que controla la transcripción de varias moléculas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-x_L, etc. La activación de NFκB depende de la molécula HPK1 (del inglés *hematopoietic progenitor kinase 1*). Esta seria-treonina quinasa actuaría como interruptor o diferenciador de la fase de expansión y la de sensibilización a AICD dado que en la fase de expansión clonal se presenta en su forma entera siendo esencial en la señalización del TCR y en la activación de NFκB. Sin embargo en células activadas tras varios ciclos de proliferación HPK1 se digiere por caspasas en dos fragmentos C- y N-terminal, de los cuales el fragmento C-terminal está implicado en la sensibilización de las células T a la AICD dado que impide la activación de NFκB. Además de la activación de NFκB, la activación completa del TCR da lugar a síntesis y secreción de IL-2. Esta citoquina señala a través de su receptor IL2R compuesto de varias subunidades. Mientras que IL2Rβ da lugar a ha señales de supervivencia y proliferación, la señalización del receptor IL2Rα provoca el incremento de la expresión de FasL y la supresión de la molécula antiapoptótica c-FLIP (del inglés *cellular FLICE inhibitory protein*) llevando a la sensibilización de las células al mecanismo de AICD. Otras citoquinas involucradas en el control de la AICD son la IL-15 que tendría un efecto supresor al señalar a través de IL2Rβ e IL2Rγ pero no de IL2Rα que es substituido por IL15Rα, y las citoquinas IL-4, IFNγ y TNFα que tendrían un efecto sensibilizador a la AICD de manera dependiente (IL-4) o independiente (IFNγ y TNFα) de la IL-2. Dentro de la estructura del TCR se sabe que CD3ζ es esencial para la inducción de AICD (Sahuquillo et al., 1998) así como las moléculas Zap70 (Eischen et al., 1997) y Lck (González-García et al., 1997) implicadas en su señalización. Adicionalmente la activación del TCR da lugar al incremento del flujo de Ca²⁺ y, a través de Zap70, LAT, SLP76 y PLCγ1, provoca la generación de ROS (del inglés *reactive oxygen species*) en la mitocondria. Este último suceso conlleva la inhibición de la expresión de Bcl-2 y, junto con el primero, a la expresión de FasL. La expresión de Fas y FasL y su interacción da lugar a la formación del complejo DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*). Este complejo está formado por FADD (Fas-associated death domain), la procaspasa 8a y b, la procaspasa 10 y la procaspasa 2. Aunque este complejo esta inhibido por la unión de cFLIPs, esta molécula se va degradando a lo largo de la expansión clonal y en última instancia la reactivación del TCR da lugar a la recolocalización de Fas en dominios lipídicos específicos que facilitan su activación dando lugar a la activación de las caspasas y finalmente a la muerte celular. Además de estos receptores se sabe que en AICD también intervienen el receptor TNFR1 que responde frente a TNFα, que lo haría en una fase tardía de la AICD, y el receptor TRAILR y su ligando TRAIL que mediarían el proceso de apoptosis en células CD8⁺ (Brenner et al., 2008).

Defectos en estos mecanismos pueden dar lugar a la aparición de enfermedades autoinmunes (Shlomchik et al., 2002).

Enfermedades autoinmunes

¿Que son?

Las enfermedades autoinmunes son aquellas generadas por la respuesta del sistema inmunológico frente a antígenos propios del organismo del individuo y que implican la activación de las células B, T o ambas. Se pueden dividir en dos grupos, las enfermedades autoinmunes órgano específicas y aquellas denominadas sistémicas (Davidson y Diamond, 2001).

Clasificación de las enfermedades autoinmunes.

Enfermedades autoinmunes órgano específicas: como el propio nombre indica son aquellas en las que el autoantígeno causante de la activación del sistema inmune se localiza en un determinado órgano del individuo. Ejemplos de enfermedades órgano específicas son la enfermedad celíaca, la diabetes tipo I o insulina dependiente y a la tiroiditis de Hashimoto.

Enfermedades autoinmunes sistémicas: son aquellas en las que el antígeno se localiza en todos los órganos del cuerpo o bien es causada por diferentes autoantígenos localizados en diferentes órganos o tejidos. Ejemplos de estas enfermedades son la esclerodermia, la poliomiositis y el lupus eritematoso sistémico (LES).

Lupus Eritematoso Sistémico

¿Qué es el LES? Diagnóstico y clasificación.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmune y origen multifactorial (D'Cruz et al., 2007).

El LES cursa a través de un amplio rango de síntomas, pudiendo afectar a todos los órganos y tejidos del cuerpo, aunque hay algunos órganos más comúnmente afectados, tal y como se muestra en la Tabla I (Gill et al., 2003).

El diagnóstico del LES se realiza por la determinación de al menos cuatro de los once criterios clínicos y de laboratorio definidos por el *American College of Rheumatology* (Tabla II).

Clínicamente, la enfermedad pasa por periodos de exacerbación de los síntomas existentes y/o aparición de otros nuevos, alternando con periodos de estabilidad o incluso remisión. Se establecen así dos grupos de pacientes; pacientes en estadio inactivo y pacientes en estadio activo. En la literatura científica, existen diferentes métodos para evaluar la situación clínica de un paciente diagnosticado de LES. De todos ellos el más utilizado, por su fiabilidad y su facilidad de uso, es el SLEDAI (del inglés *Systemic Lupus Erythematosus disease activity index*; Anexo I; Ramsey-Goldman y Isenberg, 2003). Este es un método numérico en el que a cada signo o síntoma se le asigna una puntuación; la suma

total de los puntos obtenidos se compara con un baremo, según el cual, se considera comúnmente a un paciente en estado inactivo si tiene menos de 4 puntos y activo con 4 o con más de 4 puntos (Wallace et al., 2009).

Órgano/Sistema	% de pacientes	Síntomas
Constitucional	50-100	Fatiga, fiebre en ausencia de infección, pérdida de peso.
Piel	73	Eczema en forma de mariposa en la cara, Fotosensibilidad, alopecia, heridas en mucosa, Raynaud, púrpura
Músculo esquelético	62-67	Artritis, artralgia, miositis.
Renal	21-50	Proteinuria, hematuria, posos celulares en orina, síndrome nefrótico.
Tejido Hematológico	36	Anemia, trombocitopenia, leucopenia
Órganos Reticuloendoteliales	7-23	Linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia.
Tejido Neurológico	12-21	Psicosis, mielitis transversal, neuropatías craneales y neuropatías periféricas.
Órganos Gastrointestinales	18	Nauseas, vómitos, ...
Tejido Cardíaco	15	Pericarditis, endocarditis, miocarditis, síndrome antifosfolípido.
Tejido Pulmonar	2-12	Pleuritis, hipertensión pulmonar, enfermedad del parénquima del pulmón.

Tabla I. Frecuencia de afectación de diferentes órganos en pacientes con LES.

Tratamiento

El tratamiento actual se compone principalmente de inmunosupresores (glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos u otros) y antimaláricos. El uso de los antimaláricos, dado su efecto antiinfeccioso y antiinflamatorio, es fundamentalmente para el tratamiento de las lesiones de piel y como inmunosupresor al impedir en parte la activación de los linfocitos. El uso de estos medicamentos ha permitido ampliar la esperanza de vida y en algunos casos pasar de una enfermedad mortal a una enfermedad crónica. No obstante, el uso de estos fármacos (tales como la prednisona, ciclofosfamida, etc.) conlleva una serie de efectos adversos que en ocasiones son graves y propician la interrupción del tratamiento (Sibilia et al., 2006). Esto hace necesario el estudio de nuevas dianas terapéuticas que presenten menor número de efectos adversos.

1. **Erupción malar:** Eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares, que no suele afectar los surcos nasogenianos.
2. **Erupción discoide:** Placas eritematosas altas, con descamación queratósica adherente y tapones foliculares; puede haber cicatrices atróficas en las lesiones más antiguas.
3. **Fotosensibilidad:** Erupción cutánea a causa de una reacción insólita a la luz solar, referida por el paciente u observada por el médico.
4. **Úlceras bucales:** Ulceración nasofaríngea, por lo común indolora, observada por un médico.
5. **Artritis:** Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor a la palpación, tumefacción o derrame.
6. **Serositis:** Pleuritis o pericarditis documentada por electrocardiograma o frote o evidencia de derrame pericárdico.
7. **Enfermedad renal:** Proteinuria persistente mayor a 0,5g/día o 3+ o cilindros celulares.
8. **Trastorno neurológico:** Convulsiones o psicosis en ausencia de otra causa conocida.
9. **Trastorno hematológico:** Anemia hemolítica o leucopenia ($<4.000/\text{mm}^3$) o linfopenia: ($<1.500/\text{mm}^3$) o trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración.
10. **Trastorno inmunológico:** Anti-ADN, anti-Sm, y/o Anticuerpos antifosfolípidicos (AFL).
11. **Anticuerpo antinuclear:** Un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico.

Tabla II. Criterios de clasificación para el diagnóstico del LES.

Prevalencia y factores de la enfermedad.

La patología del LES presenta una prevalencia variable en función de la población objeto de estudio, presentando mayor incidencia en la raza negra y afroamericana (200 casos por 100.000 habitantes) (Rahman y Isenberg, 2008). Estudios de agregación familiar, muestran que la prevalencia de la enfermedad en hijos de individuos diagnosticados es de entre el 2,6 y 3,5%, en comparación a la observada en descendientes sanos (0,3 - 0,4%). Asimismo, la probabilidad de que ambos gemelos padezcan esta enfermedad es de entre el 24 y el 56%, mientras que en los mellizos se reduce al 2-5% (Niaudet., 2009). Estos datos indican la importancia de los factores genéticos en el origen de la enfermedad, de hecho numerosos estudios describen la existencia de distintos alelos de susceptibilidad, la combinación de varios de estos alelos en un individuo van a propiciar el desarrollo de la enfermedad del LES. En referencia a las células T se han encontrado ciertos polimorfismos de un único nucleótido en genes implicados en las vías de activación de éstas células y cuyas alteraciones podrían generar respuestas anómalas (Rahman y Isenberg, 2008; Tsokos., 2011).

Sin embargo, existen también diversos factores ambientales que intervienen en la manifestación de la patología. Dentro de estos factores ambientales los hay bien definidos como son la exposición a la luz solar. Se cree que los rayos ultravioletas pueden provocar la apoptosis de los queratinocitos que liberaran antígenos nucleares favoreciéndose así el reconocimiento de estos autoantígenos (Lehmann y Homey, 2009; Caricchio et al., 2003). Otros factores son de origen vírico; en el caso de el virus

de Epstein-Barr, éste presenta en su estado latente un péptido que provoca una reacción cruzada con la proteína nuclear RO, favoreciendo la respuesta antigénica frente a este autoantígeno (Simard y Costenbader, 2007). Finalmente algunas drogas como la quinidina, la hidralacina o la procainamida parecen tener un efecto similar al de la luz ultravioleta (Rahman y Isenberg, 2008).

El sexo del individuo potencia la manifestación de la enfermedad y la gravedad de ésta. Así, el LES se manifiesta con una proporción de 9 mujeres por cada hombre en el rango de edad fértil (12-45 años), siendo la proporción de 2 mujeres por cada hombre fuera de este rango de edad. Se sabe que las hormonas femeninas, en concreto el estrógeno, muestran un importante papel en la regulación del sistema inmunológico, actuando como activadoras, lo que podría explicar su papel en la patogénesis del LES (Gill et al., 2003; D'Cruz et al., 2007; Simard y Costenbader, 2007; Rahman y Isenberg, 2008). De hecho, en distintos modelos de la enfermedad en ratón existe una mayor incidencia y gravedad de la enfermedad en hembras que correlaciona con la presencia de un mayor número de células autorreactivas (Rubtsov et al., 2010). Sin embargo este tema se sigue discutiendo hoy en día.

Alteración de los mecanismos de tolerancia en el LES: patología celular y molecular.

Los distintos factores de riesgo antes explicados (genético, ambiental y hormonal) van a desembocar en la activación de las células T y B y en la evasión de algunos de los mecanismos de tolerancia periférica a los que están sometidas estas células (Shlomchik et al., 2002).

En referencia a los **mecanismos de tolerancia** no existen trabajos realizados en pacientes con LES sobre el estado de la **tolerancia central**. Sin embargo, estudios realizados en el modelo MRL/lpr de ratón indican que este mecanismo no presenta deficiencias comparado con el de los ratones de fenotipo salvaje MRL/MpJ (Fatenejad et al., 1998).

En cuanto a los **mecanismos de tolerancia periférica**, se sabe que muchos de éstos están comprometidos en los individuos con esta patología. Adicionalmente existen varios factores extrínsecos a las células T de los pacientes con LES que favorecen o facilitan el que éstas células responden a autoantígenos. En primer lugar se ha descrito que los queratinocitos, células de la piel, de individuos con LES son más susceptibles a la apoptosis inducida por rayos ultravioleta que los individuos normales, dando lugar a una mayor generación y concentración de antígenos propios expuestos a las células del SI (Caricchio et al., 2003; Lehmann y Homey., 2009). A pesar de que este dato es actualmente muy discutido y controvertido en la literatura (Kuechle y Elkon, 2007), a esto se une un defecto en la actividad de los macrófagos de estos individuos a la hora de eliminar los antígenos resultantes de la apoptosis celular (Herrmann et al., 1998). Estos antígenos van a ser presentados por células presentadoras de antígeno a los linfocitos T favoreciendo su activación por autoantígenos.

Alteración	Efecto	Referencia
Reducción de los niveles de CD3 ζ	Alteraciones en la señalización del TCR	(Enyedy et al., 2001)
Incremento de la expresión de la cadena Fc ϵ RI γ	Alteraciones en la señalización del TCR	(Enyedy et al., 2001)
Reducción en la actividad fosfatasa de CD45	Alteraciones en la señalización del TCR	(Takeuchi et al., 1997)
Incremento de los residuos tirosina fosforilados en proteínas citoplasmáticas tras la inducción del TCR.	Alteraciones en la señalización del TCR	(Vassilopoulos et al., 1995)
Incremento de <i>rafts</i> que incluyen moléculas activadoras en la membrana celular	Incremento y aceleración de las respuestas tempranas bajo TCR.	(Krishnan et al., 2004)
Reducción en la actividad de la molécula CTLA-4	Alteración en la modulación de la activación	(Jury et al., 2010; Liu et al., 1998)
Incremento de expresión de CD40L	Coestimulador de células B. Induce la producción de autoanticuerpos.	(Desai-Mehta et al., 1996)
Incremento de la expresión y la actividad de la proteína Syk	Incremento y alteración de las respuestas tempranas bajo TCR.	(Enyedy et al., 2001)
Reducción en los niveles de Lck pero incremento en su actividad específica.	Alteración en señalización y posible relación con apoptosis espontánea	(Blasini et al., 1998; Jury et al., 2003)
Reducción de la actividad de PKC	Alteraciones en la metilación del ADN	(Gorelik et al., 2007)
Reducción de los niveles y la actividad de PKA	Alteración en la expresión de genes	(Kammer et al., 1994)
Incremento del flujo de Ca ²⁺	Activador de Calcineurina y CaMKIV.	(Tenbrock et al., 2007)
Reducción de la actividad MAPK	Alteraciones en la metilación del ADN y en la activación de AP-1	(Gorelik et al., 2007)
Incremento de la actividad de PI3K	Aumento de la supervivencia y activación	(Barber et al., 2005b)
Reducción en la producción de IL-2	Defectos en proliferación, activación y muerte celular.	(de Faucal et al., 1984; Lieberman y Tsokos, 2010)
Incremento en la expresión de GATA-3	Diferenciación de las células T a Th2	(Peng y Deng, 2009)
Reducción de la expresión de T-bet	Bloqueo de la diferenciación a Th1	(Peng y Deng, 2009)
Reducción de la actividad nuclear de NF κ B y de los niveles de p65	Reducción en la expresión de IL-2 y otros genes controlados por este factor de transcripción	(Wong et al., 1999)
Incremento de la unión de CREM al promotor de IL-2	Reducción en la expresión de IL-2 y otros genes controlados por este factor de transcripción	(Solomou et al., 2001)
Reducción de la unión de CREB al promotor de IL-2	Reducción en la expresión de IL-2 y otros genes controlados por este factor de transcripción	(Solomou et al., 2001)
Reducción de la translocación del factor nuclear AP1	Reducción en la expresión de IL-2	(Rauen et al., 2011)
Reducción de los niveles de Elf1	Reducción de la expresión de CD3 ζ y aumento de la expresión de la cadena Fc ϵ RI γ	(Juang et al., 2008)
Incremento de los niveles y la translocación al núcleo de NFATc2	Incremento de la expresión de CD40L y reducción de la expresión de IL-2	(Kytтарыs et al., 2007)

Tabla III. Alteraciones bioquímicas en células T de individuos con LES.

En esta patología las células T autorreactivas van a ser capaces de atacar por citotoxicidad a los tejidos, y colaborar con las células B. En referencia a las células T, existe una extensa literatura que refiere diferentes alteraciones moleculares relacionadas con la activación y la modulación de su actividad la cual se resume en la Tabla III (Crispin et al., 2010). Estas alteraciones inducen la activación anómala de las células T y a la expresión de moléculas por parte de estas células que lleven a la activación de las células B y a la producción de autoanticuerpos, especialmente anti-ADN y antígenos nucleares (Whittingham, 1988). En las células B de los individuos con LES también se han descrito una serie de anomalías moleculares que alteran su activación y la modulación de su actividad (Tabla IV). Los anticuerpos producidos por éstas células van a contribuir al daño renal mediante la formación de inmunocomplejos que se acumulan en los glomérulos del riñón (Tanaka et al., 2001).

Alteración	Efecto	Referencia
Incremento de IL17-RA	Alteración en la activación de las células B	(Wang et al., 2012)
Reducción en la expresión de CD72	Cambio de isotipo a IgG1 en las células B.	(Wong et al., 2009)
Reducción en la expresión de Lyn	Reducción en la inhibición de la señalización del BCR	(Flores-Borja et al., 2005)
Incorrecta localización y reducción de la actividad de CD45	Alteraciones en la señalización del BCR y expresión de determinadas moléculas.	(Flores-Borja et al., 2007)
Reducción en la expresión de CD19	Alteraciones en la señalización del BCR.	(Korganow et al., 2010)
Defectos en la señalización de FCgRIIB	Reducción en la inhibición de la señalización del BCR	(Blank et al., 2005; Enyedy et al., 2001; Floto et al., 2005; Mackay et al., 2006)
Incremento del flujo de Ca^{2+}	Incremento en la señalización a través del BCR	(Liossis et al., 1996)
Incremento de los residuos tirosina fosforilados en proteínas citoplasmáticas.	Incremento en la señalización a través del BCR	(Mackay et al., 2006)
Incremento de la fosforilación en estado basal de la MAPK p38	Alteraciones en la metilación del ADN y en la activación de AP-1	(Wong et al., 2009)
Ganancia de función de Ltk asociada a un determinado polimorfismo	Activación de la vía de PI3K	(Li et al., 2004)

Tabla IV. Alteraciones bioquímicas en células B de individuos con LES.

Además de las alteraciones moleculares intrínsecas a las células T y B se han descrito, en el suero de estos pacientes, una serie de citoquinas y factores solubles capaces de activar o facilitar la activación de células T, B y de otras células del sistema inmune. Ejemplos de estas moléculas son el IFN γ y la IL-7 (Dolff et al., 2011), citoquinas asociadas con la activación y supervivencia de las célula T, o BlyS, BAFF o April, factores asociados con la activación de las células B y la producción de autoanticuerpos (Cancro et al., 2009).

Varios estudios muestran que las células T y las células B de los pacientes de LES presentan defectos en el mecanismo de la **anergia** (Xu et al., 2004; Wang et al., 2010), aunque otros difieren en

esa conclusión (Paty et al., 1975). En función del estudio, se han propuesto diversos mecanismos para explicar dichas observaciones. Xu et al. (2004) señalan a la regulación positiva de la ciclo-oxigenasa 2 (COX2) en las células T de los individuos con LES (en condiciones de inducción de anergia y AICD) como causante de la resistencia de estas células frente a AICD y la inducción de anergia. COX2 ejercería un papel antiapoptótico dentro del núcleo de los linfocitos T, independiente de su actividad prostaglandina-endoperoxido sintasa (Xu et al., 2004). Por su parte, Wang et al. (2010) mostraron que la combinación de determinados polimorfismos en el receptor CD2 y su molécula adaptadora intracelular SLAM, explicarían la resistencia a este mecanismo de tolerancia. Este es un tema que sigue siendo controvertido y que precisa de más estudios en humanos.

La respuesta inmunológica va a ser regulada, entre otros mecanismos, por la acción de las células **T reguladoras** (Tregs) que van a limitar dicha respuesta (Kondelkova et al., 2010), y por las células **Th17** que son proinflamatorias y están relacionadas con la autoinmunidad (Wong et al., 2008; Nalbandian et al., 2009). Diversos estudios describen un menor número de células Tregs en pacientes con LES (Crispin et al., 2003; Miyara et al., 2005). Este es también un punto controvertido en el que otros estudios indican que su número es normal (Alvarado-Sánchez et al., 2006; Venigalla et al., 2008). La hipótesis más aceptada es que, al menos *in vitro*, las células Tregs de estos pacientes no son capaces de suprimir la activación y proliferación de células T activadas por distintos estímulos. Es decir, aunque el número de estas células no se vea afectado en la patología, podría ser que su función si lo esté (Miyara et al., 2005; Alvarado-Sánchez et al., 2006; Valencia et al., 2007; Venigalla et al., 2008). Con respecto a las Th17, estudios recientes han relacionado estas células con autoinmunidad en general, y con la patología del LES en particular, explicando que la producción de esta citoquina daría lugar a la amplificación de la respuesta inmunológica ayudando a la activación y reclutamiento de diversas células del SI (neutrófilos, células T, células B, etc.) (Wong et al., 2008; Nalbandian et al., 2009; Crispin y Tsokos, 2010).

Por último, varios autores han descrito la alteración del mecanismo de **AICD** en las células T humanas de individuos con LES (Kovacs et al., 1996; Xu et al., 2004). Mientras que Kovacs achaca esta resistencia a una baja producción de TNF α en las células T de individuos con LES, Xu implica también a la actividad de COX-2 en esta resistencia de las células T de individuos con LES a la AICD.

El correcto funcionamiento de estos mecanismos depende de una compleja maquinaria intra- y extracelular. Una de las familias de proteínas que se han visto implicadas en todos estos mecanismos, directa o indirectamente, es la familia de las fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K).

Fosfatidilinositol-3-quinasa

¿Qué son las PI3K?

La PI3K es una familia de enzimas caracterizadas por presentar un dominio catalítico con una baja actividad proteína quinasa y una eficiente actividad lípido quinasa. Además, estas enzimas

presentan un dominio C2 y un dominio helicoidal (Fruman et al., 1998).

Su función principal en la célula es fosforilar el residuo -OH situado en la posición 3' del anillo inositol de los lípidos fosfatidilinositoles presentes en la membrana celular (Rittenhouse, 1996). Los lípidos así generados van a actuar en el control de diversos procesos celulares.

La familia de las PI3K se divide en 3 clases atendiendo a su estructura, denominadas clase I, clase II y clase III (Fruman et al., 1998).

Clases de PI3K.

Las clases II y III han sido menos estudiadas que la clase I de PI3K. Sin embargo, se sabe que la clase II está compuesta por tres isoformas denominadas PI3K-C2 α , β y γ , de las cuales las dos primeras presentan una distribución ubicua mientras que PI3K-C2 γ se expresa principalmente en el hígado (Kok et al., 2009). Estas proteínas contienen, además de los dominios citados, un dominio de unión a Ras (Fruman y Cantley, 2002). Estudios realizados en células de mamífero implican a la clase II de PI3K en procesos tan importantes como la migración celular (Domin et al., 2005; Maffucci et al., 2005), el metabolismo de la glucosa (Falasca et al., 2007), la exocitosis (Dominguez et al., 2011), la contracción del músculo liso (Yoshioka et al., 2007) y en la apoptosis celular (Kang et al., 2005; Das et al., 2007; Elis et al., 2008).

La clase III está constituida por una única enzima, VPS34 que se asocia con otras proteínas que regulan su actividad quinasas. VPS34 está involucrada en la regulación del tráfico de vesículas y en el control de la quinasas S6K1 (Backer, 2008; Yue y Zhong, 2010).

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la clase I de PI3K.

Clase I de PI3K

Familia de las PI3K de la clase I.

Estas enzimas son las únicas capaces de utilizar PIP₂ *in vivo* generando PIP₃. Este lípido actúa como segundo mensajero a través del reclutamiento de moléculas que poseen un dominio PH (del inglés *Pleckstrin Homology domain*), así como sustrato de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*) (Fruman et al., 1998). *In vitro* también van a ser capaces de actuar sobre el fosfatidilinositol (PI) y el fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) (Fruman et al., 1998). Además pueden fosforilar proteínas en sus residuos serina (Ser) o treonina (Thr) (Wymann y Pirola, 1998) o actuar como proteínas *andamio* (Damilano et al., 2010).

La clase I de las PI3K son proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica y una reguladora. Esta clase se divide a su vez, en dos subclases, en función de sus mecanismos principales de activación y de la subunidad reguladora que unen o pueden unir (Vanhaesebroeck et al., 1997; Fruman et al., 1998; Wymann y Pirola, 1998).



Figura 3. Estructura de las subunidades catalíticas y reguladoras de la clase IA de PI3K.

La clase I de las PI3K son proteínas heterodiméricas compuestas de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Existen cuatro subunidades catalíticas y siete subunidades reguladoras. Todas las subunidades catalíticas presentan una estructura muy similar con un dominio de unión a la subunidad reguladora, un dominio de unión a Ras, un dominio C2, uno helicoidal y un dominio con actividad quinasa. En función de la subunidad reguladora que sean capaces de unir existen dos subtipos la clase I_A y la clase I_B. La clase I_A es capaz de unir cualquiera de las cinco subunidades reguladoras a las que se denomina p85 mientras que la clase I_B solo puede unir a las subunidades p101 o p87.

Subclases de la clase I de PI3K.

La **subclase I_A** está compuesta por tres subunidades catalíticas denominadas p110 α , p110 β y p110 δ . Los diferentes dominios que conforman estas isoformas catalíticas (**Fig.3**) les permiten interaccionar con cualquiera de las cinco subunidades reguladoras globalmente denominadas p85 que se han descrito en mamífero (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β y p55 γ ; **Fig.3**; Engelman et al., 2006).

A su vez, la isoforma completa de p85 contiene (**Fig.3**): un dominio SH3 (del inglés *Src homology 3*) N-terminal, seguido de un dominio de unión a CdC42-, Rac- o Rab-GTP (BCR, del inglés *breakpoint cluster region*) flanqueado por dos zonas enriquecidas en prolina, y dos dominios SH2 (del inglés *Src homology 2*) separados por un dominio de unión a la subunidad catalítica p110; esta última parte (los dos dominios SH2 y el de unión a p110) es común a las otras reguladoras más cortas. En el caso de p85 β existe un tercer dominio rico en prolina en la zona C terminal.

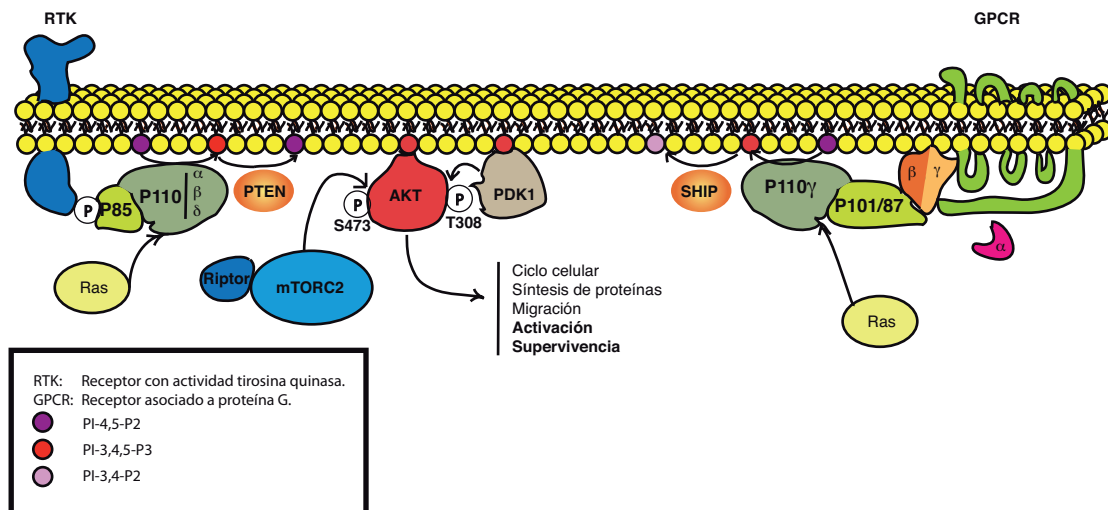


Figura 4. Activación de la clase I de PI3K.

De manera clásica, la clase I_A de PI3K se activa a través de receptores con actividad tirosina quinasa o bien asociados a proteínas con esta actividad mientras que la clase I_B lo hace en respuesta a receptores asociados a proteína G. Sin embargo nuevos estudios han revelado que la subunidad p110 β es capaz de activarse por GPCRs y la isoforma catalítica p110 γ se activa bajo respuesta del TCR. La activación de estas subunidades da lugar a la generación de PIP₃ en la membrana que recluta proteínas que poseen dominios PH, de esta manera activan diferentes rutas celulares de las cuales la más importante es la de PKB.

Esta subclase es activada, principalmente, por receptores con actividad tirosina (Tyr) quinasa o asociados a actividad tirosina quinasa. Ejemplos de estos receptores asociados a actividad tirosina quinasa son el receptor de células T (TCR) y el receptor de células B (BCR) (Fruman y Cantley, 2002; **Fig.4**). De manera común la unión de los dominios SH2 de las subunidades reguladoras a las proteínas receptores o adaptadoras es a través de los motivos fosforilados Tyr-X-X-Met (Rordorf-Nikolic et al., 1995). Sin embargo no es la única forma de activación de esta subclase de proteínas como se demuestra en células T y B. La eliminación en estas células de la GTPasa Rac o de sus activadores de la familia Vav, conduce a defectos en la activación de PI3K, lo que sugiere que la unión del dominio BCR de p85 a Rac-GTP en respuesta a la señalización por los receptores TCR o BCR (B cell receptor) da lugar al reclutamiento y activación de PI3K (Reynolds et al., 2002; Vigorito et al., 2004; Walmsley et

al., 2003). Los dominios ricos en prolina de p85 también ofrecen una forma alternativa de activación de la clase I_A de PI3K ya que permite la unión del dominio de SH3 de las proteínas de la familia Src que da lugar a la estabilización del complejo p85-p110 y a que ambas subunidades adapten una conformación activa (Fruman et al., 1998). De manera adicional las Src quinasas van a cumplir también una importante función en la activación de la vía clásica de activación de la clase I de PI3K ya que van a generar los lugares de unión de la subunidad reguladora de PI3K mediante la fosforilación de los residuos Tyr en determinadas moléculas adaptadoras. Además, en el caso de p110β, se sabe que puede ser activada también por receptores asociados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*; Guillermet-Guibert et al., 2008).

Las subunidades p110α y p110β son expresadas de forma ubicua y su ausencia es letal en fase embrionaria a 3,5 y 9 días respectivamente (Bi et al., 1999; Bi et al., 2002). La isoforma catalítica p110δ se expresa principalmente en células de origen hematopoyético (Hiles et al., 1992), aunque se ha detectado la presencia de esta proteína en fibroblastos (Kok et al., 2009b) y neuronas (Eickholt et al., 2007). No obstante, y aunque el papel de esta proteína es fundamental en el correcto control de diferentes respuestas celulares, especialmente en el sistema inmunológico, los ratones *knock out* (KO) de p110δ son viables (Okkenhaug et al., 2002).

La **subclase I_B** de PI3K, se activa principalmente a través de la acción de los GPCRs, como por ejemplo los receptores de citoquinas (Stephens et al., 1994). Su expresión, al igual que la de la subunidad p110δ, se ha considerado exclusiva al sistema hematopoyético, aunque recientemente se ha demostrado su expresión en endotelio (Frey et al., 2006), músculo liso (Quignard et al., 2001), neuronas (Brunert et al., 2010) y cardiomiocitos (Perino et al., 2011). Esta subclase está constituida por una subunidad catalítica denominada p110γ que comparte la mayoría de los dominios de las otras a excepción de la región N terminal (de unión a p85 en clase I_A; **Fig.2**). Esta modificación explica por qué p110γ no puede interaccionar con p85. Sin embargo, si puede interaccionar con cualquiera de las otras 2 subunidades reguladoras denominadas p101 y p87^{pikap} (Stephens et al., 1997; Voigt et al., 2006). Los ratones deficientes para esta proteína son viables pero muestran defectos en diferentes células del sistema inmune (células T, macrófagos y neutrófilos; Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000).

Adicionalmente, las subunidades p110 incluyen un dominio de unión a la proteína G pequeña Ras, que a su vez es capaz de activar también a la clase I de PI3K (Rodríguez-Viciano et al., 1996; Rubio et al., 1997; **Fig.4**).

Las proteínas p110δ y p110γ han sido objeto de diversos estudios, los cuales han demostrado su función en las distintas células del SI. La importancia en el control de estas funciones, así como el hecho de que los animales KO son viables, las colocan como posibles dianas terapéuticas en distintas patologías de el SI.

La clase I de PI3K en el sistema inmunológico.

El sistema inmunológico está compuesto por un conjunto de tipos celulares, denominados en conjunto leucocitos. Las diversas funciones de estas células van a ser controladas a través de receptores, tanto de superficie como intracelulares, la mayoría de los cuales se van a englobar dentro de la familia de receptores asociados a actividad Tyr quinasa (TCR, BCR, CD28, ICOS, FC ϵ RI, Fc γ ,...) o a receptores tipo GPCR (receptores de quimioquinas y citoquinas). Como ya se ha comentado, estos receptores van a tener en común la capacidad de activar a las proteínas de la clase I de PI3K (**Fig.3 y 4**). La formación de PIP₃ en membrana por acción de estas proteínas da lugar al reclutamiento y activación de diversas proteínas entre las que se encuentran las efectoras de PI3K (**Fig.3**). Dos familias de efectores de PI3K presentan un papel especialmente interesante dentro de la regulación del SI: estas son las proteínas Tyr quinasa pertenecientes a la familia Tec (Tec, Btk, Itk, Etk y Rlk) implicadas en procesos de migración mediante el control de diferentes mecanismos como la propia activación celular bajo receptores de quimioquinas y la reorganización del citoesqueleto (Gómez-Rodríguez et al., 2007), y las proteínas serina/treonina quinasa pertenecientes a la familia AGC (PDK-1, PKB, RSK, SGK, ciertas isoformas de PKC y la S6 quinasa) implicadas en procesos de crecimiento celular, proliferación, supervivencia y metabolismo celular (Bayascas, 2010). De estas proteínas, PKB ha sido descrita como el principal efector de PI3K en las rutas de proliferación y supervivencia celular (Fayard et al., 2007; **Fig.3**).

La activación de PI3K por cualquiera de los mecanismos antes mencionados da lugar a la generación de PIP₃ que recluta a PKB. Una vez en membrana, PKB va a ser fosforilado por PDK-1 (del inglés *phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) en el residuo Thr³⁰⁸ (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998), que a su vez favorece la posterior fosforilación en la posición Ser⁴⁷³ por mTORC₂ (Sarbasov et al., 2005). PDK1 es otro efector de PI3K que se localiza en la membrana por unión de PIP₃. Estas proteínas activan e inhiben diversas rutas celulares, implicando así a PI3K en el control de diversos procesos celulares como la activación, la migración, la síntesis proteica, el ciclo celular y la supervivencia/apoptosis celular (Dufner y Thomas, 1999; Fruman, 2004; Krasilnikov, 2000; Okkenhaug et al., 2004; Cain y Ridley, 2009; Werner et al., 2010).

Además de por la actividad de PI3K, la cantidad de PIP₃ en las células del sistema inmune está controlada por la actividad de dos fosfatasa, PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homolog*) (Maehama y Dixon, 1998) y SHIP (del inglés *SH2-containing inositol phosphatase*; Scharenberg et al., 1998). PTEN hidrolizará el fosfato de la posición 3' de PIP₃, el introducido por PI3K, controlando así esta vía de supervivencia y proliferación celular. Por su parte SHIP, familia de proteínas compuesta por las isoformas SHIP1 y SHIP2, elimina el fosfato de la posición 5' de PIP₃ dando lugar al fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (Pesesse et al., 1998). Esta acción sirve tanto para bloquear la señalización de PI3K a través de las Tec quinasas, controlando también esta vía de supervivencia celular (Tomlinson et al., 2004), como para diversificar la señalización de PI3K en las células del sistema inmune. Este lípido, PI-3,4-P₂ une determinadas proteínas con dominios PH específicos para éste lípido, y también recluta

proteínas que contienen el dominio PX (del inglés *Phox homology*), involucradas en mecanismos de control de tráfico de membrana (Xu et al., 2001). Gracias al control de estas rutas, la clase I de PI3K va a estar implicada en el correcto comportamiento de distintas células del SI.

Funciones de las isoformas p110 δ y p110 γ de la clase I de PI3K en las principales células del sistema inmunológico relacionadas con el LES.

Macrófagos

En macrófagos, p110 δ está implicada en la secreción de citoquinas (Dos Santos et al., 2007; Papakonstanti et al., 2008) mientras que p110 γ es responsable de la migración de estas células a los lugares de inflamación (Hayer et al., 2009).

Neutrófilos

En estas células las isoformas p110 δ y p110 γ se expresan en altos niveles en comparación con la mayoría de las otras células. La isoforma p110 δ junto con p110 β es responsable en neutrófilos del control de la producción especies reactivas de oxígeno (la inhibición de a la vez de ambas isoformas da lugar a una importante reducción de estos radicales) y de funciones relacionadas con la organización del citoesqueleto en respuesta a *Aspergillus Fumigatus* (Boyle et al., 2011). La inhibición de la actividad de p110 δ da lugar a la desregulación de la síntesis y secreción de determinadas citoquinas como IL-8 y quimioquinas como Mip-1 α y Mip-1 β , elementos importantes en la formación y expansión de la respuesta inflamatoria (Fortin et al., 2011). Además, la inhibición de p110 δ también impide la migración mediada por la integrina- β 2, necesaria para el reclutamiento de los neutrófilos en la zona de inflamación (Boyle et al., 2011), así como de la dependiente del leucotrieno B4 (LTB4), donde también interviene la isoforma p110 γ (Randis et al., 2008). Esta última isoforma es responsable, en estas células, del control de la ruta de producción de las citoquinas IL-1 β y TNF α en respuesta a endotoxinas (Yum et al., 2001).

Mastocitos

La isoforma p110 δ es la mas abundante en mastocitos, como demuestra el hecho de que el 90% de la actividad PI3K es eliminada en las células de los ratones que expresan una isoforma de p110 δ catalíticamente inactiva (Dos Santos et al., 2007). Esta isoforma controla la adhesión a fibronectina de los mastocitos a través de la modulación de la actividad de VLA-5 (Kinashi et al., 2000). Junto con p110 β , p110 δ controla el flujo de Ca²⁺ y la liberación de gránulos tras la estimulación a través del Fc ϵ RI. Esto lo hace mediante la modulación de la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (Smith et al., 2001; Windmiller y Backer, 2003; Tanemura et al., 2009). La isoforma p110 γ también se encuentra implicada en estos procesos de migración y la liberación de gránulos de estas células.

Células NK

La secreción de IFN γ , TNF α y GM-CSF en las células NK requieren de la actividad de p110 δ . Sin embargo, p110 γ es también requerida para la citotoxicidad de estas células (Kim et al., 2007), así

como en la producción de IFN γ . Ambas subunidades catalíticas se encuentra implicadas en el desarrollo y en la migración de las células NK (Saudemont et al., 2009).

Células Dendríticas

Con respecto a las células dendríticas, p110 δ está implicada en el control de la producción de la IL-6 en respuesta a la estimulación del receptor cKIT por SCF (del inglés *Stem cell factor*; Krishnamoorthy et al., 2008) y en la activación de éstas células por HGF (del inglés *Hepatocyte growth factor*; Singhal y Sen, 2011). La isoforma p110 γ controla la quimiotaxis en respuesta a quimioquinas tales como CCL3, CCL5 y CCL19 tanto *in vitro* como *in vivo* (Del Prete et al., 2004).

Células B

De todas las células del sistema inmunológico, la más dependientes de la actividad de la clase I de PI3K, son las células B. Esto se pone de manifiesto en ratones deficientes en la subunidad p85 α , la cual confiere estabilidad a las subunidades catalíticas p110 de la clase I $_A$. En estos ratones se ha reportado una drástica disminución del número de células B-1, células B de la zona marginal y células B foliculares (Fruman et al., 1999). Se sabe que esta actividad PI3K es función de la isoforma p110 δ , ya que en los ratones que expresan una isoforma de p110 δ catalíticamente inactiva, las células B muestran defectos en diferenciación bloqueándose el desarrollo en la médula ósea, y en la activación incluyendo la estimulación dependiente de células T (Okkenhaug et al., 2002; Jou et al., 2002). Estos datos se contradicen en parte los publicados por Clayton et al. (2002) con un animal KO para *pik3cg*, que no reporta dicho bloqueo en diferenciación, aunque si en el defecto en activación. Sin embargo todos coinciden en el papel fundamental de p110 δ en el desarrollo de las células B1 y las células B de la zona marginal (MZB). Además se ha encontrado que p110 δ tiene un importante rol en proliferación, quimiotaxis, y en la liberación de citoquinas y quimioquinas tanto bajo estímulos fisiológicos como patológicos en las células B (Okkenhaug y Vanhaesebroeck, 2003; Dil y Marshall., 2009; Low et al., 2010). Este mismo fenotipo se ve en los animales en los que se ha eliminado p110 δ (Okkenhaug et al., 2002; Ramadani et al., 2010). La importancia de p110 δ para la expansión y supervivencia de células B es la base para la utilización de esta proteína como diana en patologías tumorales de células B mediante el uso de inhibidores específicos (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?intr=%22CAL-101%22>).

Con respecto a las otras isoformas de PI3K, p110 γ juega un papel totalmente secundario en estas células, mientras que p110 α también participa en el desarrollo de las células B, en concreto es necesaria junto con p110 δ , en la señalización del receptor de las células pre-B (Ramadani et al., 2010).

Células T

En el caso de las células T existe una redundancia de función entre las isoformas p110 δ y p110 γ . La eliminación de p85 α y p85 β en las células T de ratón, lo que provoca la supresión de la mayor parte

de la señalización de la clase I_A, da lugar a animales con un número de timocitos normal (Deane et al., 2007). Esta misma observación fue realizada con los animales que expresan en células T una isoforma catalíticamente inactiva de p110δ y en aquellos en los que esta isoforma se ha eliminado. Sin embargo las células T de los animales p110γ KO muestran defectos en el desarrollo mostrando un reducido número de timocitos y un papel exclusivo de esta isoforma en este punto (Sasaki et al., 2000). Sin embargo, el doble KO de estas isoformas muestra un bloqueo más temprano, en fase Doble negativa 3- Doble negativa 4, lo que indica que estas isoformas van a ser capaces de cumplir, hasta cierto punto, una la función de la otra en éste paso.

En células maduras p110δ es la responsable de la activación de PKB vía TCR en presencia o no del coestimulador CD28, en un proceso que implica la intervención de las src quinasas y la proteína Nck que mantiene estable el complejo CD3 en conformación abierta y recluta moléculas adaptadoras para la activación de PI3K (Gil et al., 2002), lo que se observa tanto en animales deficientes de la actividad p110δ como en aquellos doble KO para las subunidades reguladoras. (Okkenhaugh et al., 2002; Deane et al., 2007; Garcon et al., 2008). Esto puede explicar los defectos observados en proliferación y producción de citoquinas en células T maduras en ratones deficientes para la actividad de p110δ (Okkenhaugh et al., 2002; Patton et al., 2006; Deane et al., 2007; Nashed et al., 2007) y los defectos en la respuesta secundaria de las células T de memoria debido a defectos en su generación, función y reclutamiento a las zonas de infección (Liu et al., 2009). Los defectos en proliferación y generación de citoquinas también se han observado en células T humanas con el uso de inhibidores específicos de esta isoforma *in vitro* (Soond et al., 2010). Además se sabe que p110δ tiene un papel en la supervivencia de las células T efectoras y en la diferenciación de las células Th17 (Haylock-Jacobs et al., 2011).

Por su parte, los animales KO para p110γ muestran una reducida proliferación tras la estimulación vía TCR junto con una reducción en la migración en respuesta a los ligandos de los receptores CCR7 y CXCR4 *in vitro* en células maduras (Sasaki et al., 2000; Alcázar et al., 2007) e *in vivo* células T de estos animales presentan defectos en la migración a los órganos linfáticos periféricos (Thomas et al., 2008).

La isoforma p110β, junto con p110δ, participa en la señalización redox en células T, aquella en la que se generan especies reactivas de oxígeno que actúan como segundo mensajero para la activación de el factor nuclear-κB (Deora et al., 1998).

p110α sería la isoforma dominante en la regulación de FoxP₃ (Sauer et al., 2008), mientras que p110δ sería la responsable del control de la función y supervivencia de estas células (Patton et al., 2006). Se ha relacionado a p110α en el control de la producción de citoquinas bajo estímulo de TCR, así como en el aumento de tamaño de las células T activadas bajo estímulo de ICOS (Acosta et al., 2011).

Todos estos estudios demuestran que la vía de PI3K en leucocitos va a estar ligada con el control de distintos procesos como supervivencia, proliferación, migración, síntesis proteica y la propia activación celular, teniendo como principales actores a las isoformas p110δ y p110γ, cuya desregulación está íntimamente ligada con procesos oncogénicos y autoinmunes, y situando a estas dos isoformas de

PI3K como posibles dianas terapéuticas en distintas patologías del sistema inmunológico.

La clase I de PI3K y la enfermedad LES en ratón

Borlado et al. (2000) generaron un modelo de ratón transgénico en el que se expresa una forma truncada de la subunidad reguladora p85 bajo el promotor proximal de Lck. Esto provoca que esta isoforma alterada de p85 se exprese de manera específica en células T, B-1 y NK (Gadue et al., 1999; Majolini et al., 1998; Veillette et al., 1988). Esta proteína truncada va a asociar y activar, de manera constitutiva, las isoformas catalíticas de la clase I_A de PI3K (p110 α , β y δ), induciendo así la activación de efectores entre los que se encuentra PKB. Estos ratones mueren por daño renal y muestran la presencia de autoanticuerpos anti-doble cadena de ADN, daños en la piel y problemas de movilidad junto con un desorden linfoproliferativo infiltrante. Este desorden se debe al incremento de la población de células CD4 de memoria (CD44^{high}CD62L^{low}CD45RB^{low}) que se acumulan en bazo y en los nódulos linfáticos e invaden ciertos órganos como los riñones y los pulmones. La sintomatología recuerda a la observada en la enfermedad humana LES. El análisis de estas células CD4⁺ CD44^{high}CD62L^{low}CD45RB^{low} muestra una alteración en los mecanismos de muerte a pesar de que presentan un incremento en la expresión de la molécula Fas, un receptor de membrana que señala y desencadena uno de los mecanismos de apoptosis en las células.

Di Cristofano et al. (1999) mostraron que el ratón heterocigoto para la deficiencia de PTEN también desarrolla una enfermedad similar al LES y a la observada en el modelo de p65^{PI3K}. Debido a la ausencia de uno de los alelos de PTEN, el mayor supresor de la vía de PI3K, las células de estos ratones tienen la ruta de PI3K constitutivamente activa. Los ratones presentan una expansión de las células CD4 con fenotipo memoria/efectoras, aunque en este caso también observan la expansión de células B que, junto con las T, invaden el bazo, nódulos linfáticos y otros tejidos, en especial el pulmón. Esto es debido a que la deficiencia en PTEN afecta a un mayor rango de células del sistema inmunológico que el modelo anterior. En este estudio los autores mostraron que aunque los niveles de Fas están incrementados en esas células, existe una resistencia a AICD debida a la activación de la ruta PI3K/PKB

Un fenotipo más fuerte fue observado por Suzuki et al. (2001) al generar los ratones PTEN^{flox/-} y cruzarlos por los Lck-CrePten^{flox/-}. Estos ratones eliminan el único alelo que mantienen de PTEN en células diversas células del sistema inmune ya que expresan Cre bajo el promotor de Lck que se activa en células T, B-1, NK. Los autores observan una linfadenopatía generalizada incluyendo esplenomegalia y crecimiento del timo en animales adultos. El análisis de las poblaciones celulares mostró una gran expansión de células CD4 que presentaba una activación espontánea (observada por la expresión de CD69) y una mayor producción de citoquinas tanto Th1 (IL-2 e IFN γ) como Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), pero también de células B observando además títulos de inmunoglobulinas, especialmente IgG1, más alto en el suero de estos ratones que en los WT o en los PTEN^{+/-}. A pesar de que estos animales mueren por linfomas el análisis histológico muestra signos típicos de la enfermedad del LES tanto en

como son la infiltración de células T en distintos órganos como pulmón, riñón e hígado; además de las alteraciones celulares y serológicas características de esta enfermedad. Mediante una serie de elegantes experimentos los autores demuestran que la delección de PTEN causa la incorrecta selección negativa de los timocitos así como una anomalía en la selección positiva de las células simple positivas para CD8 que favorece la acumulación de las células CD4⁺. Además también demuestran que los linfocitos T que salen a sangre periférica en estos ratones son resistentes a la AICD.

Rathmell et al. (2003) desarrollaron otro modelo de ratón transgénico en el cual introdujeron una forma constitutivamente activa de PKB bajo el promotor de Lck (mPKB). La expresión de esta proteína truncada daba lugar a la acumulación de células T CD4⁺ y células B, mientras que el número de las células CD8⁺ solo fue incrementado de manera modesta. Todas estas células presentaban la expresión en altos niveles de la molécula CD44 lo que indica que estas células estaban activadas. A pesar de que estos ratones mueren por el desarrollo de un linfoma tímico, se observó en los animales más viejos la formación de inmunocomplejos en los riñones.

Finalmente, Parsons et al. (2001) con un modelo transgénico en el que introducen otra forma activa de PKB (gag-PKB) bajo el promotor de CD2, lo que provoca que se exprese en los linfocitos T y B (Turner et al., 2006), observaron el desarrollo de una patología sistémica de origen autoinmune semejante a la observada en los ratones PTEN^{+/-} con acumulación de células T CD4⁺ y células B caracterizadas por ser resistentes al mecanismo de AICD.

Todos estos estudios muestran que la desregulación positiva de la vía PI3K da lugar a la activación de las células T y B y a la de la tolerancia del sistema inmunológico afectando especialmente al mecanismo de AICD.

PI3K como diana terapéutica en modelos de LES en ratón

Estudios previos han demostrado que la supresión del gen *pik3cg*, que codifica para la subunidad catalítica de la clase I_β de las PI3K (p110γ) en los ratones p65^{PI3K}, no evitaba la linfoproliferación ni el comportamiento invasivo de estas células en órganos como el pulmón. Sin embargo, sí se detectó una bajada de los niveles de células CD4 con fenotipo de memoria (aquellas que expresan altos niveles de la molécula CD44), un descenso en la producción de auto-anticuerpos y la reducción de su índice de glomerulonefritis (Barber et al., 2005a).

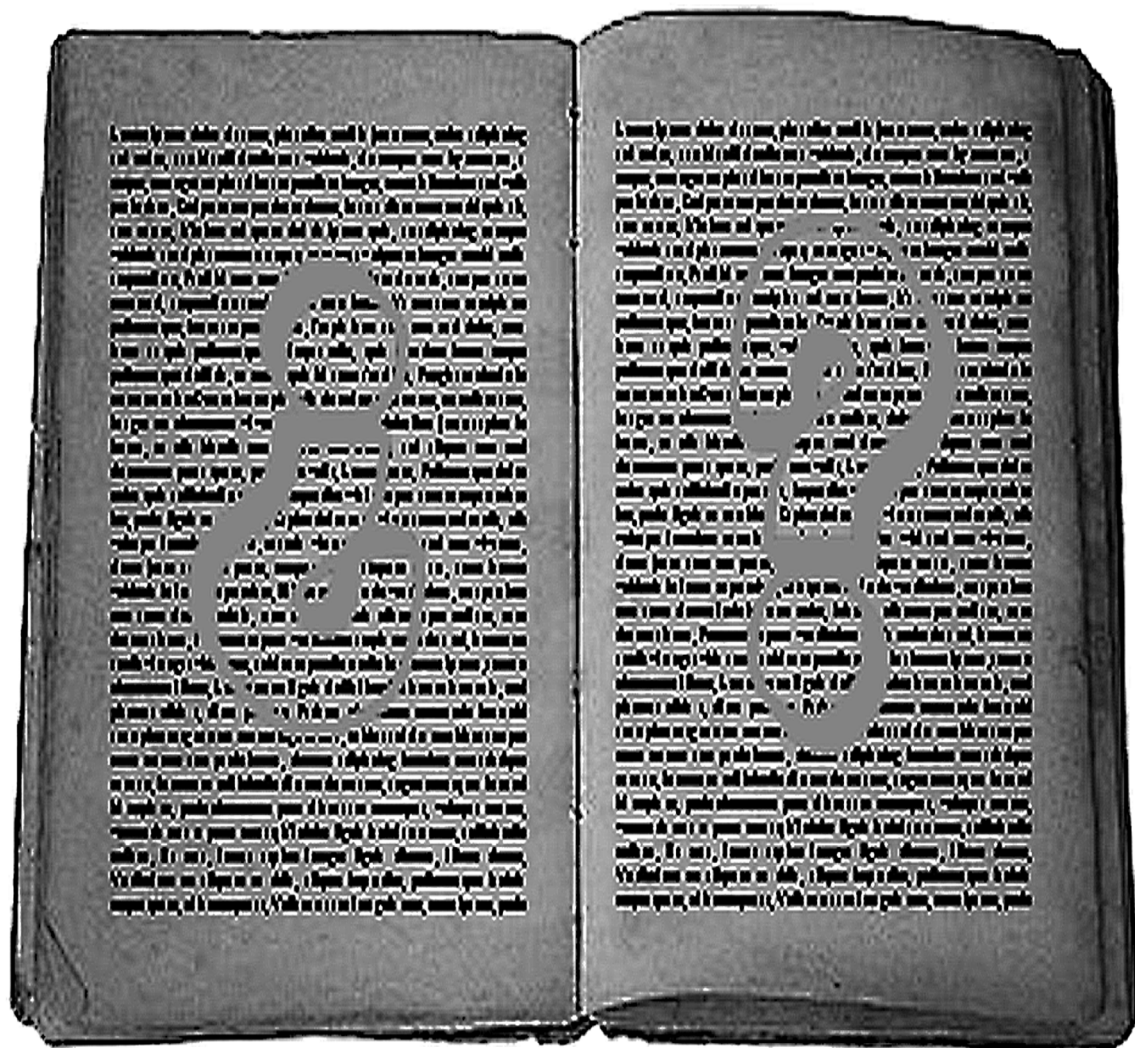
La inhibición de p110γ en los ratones MRL/lpr otro modelo de LES que presenta activación de la ruta de PI3K/PKB, da lugar al bloqueo del desarrollo de la enfermedad en aquellos animales que aún no la padecen, e incluso a la cura de aquellos que ya la presentan. Estos animales, adicionalmente al fondo genético que los hace desarrollar una patología semejante al LES humano, presentan la delección del gen Fas, importante en la vía de AICD, lo que hace que desarrollen la enfermedad de una manera mucho

más rápida (Watson et al., 1992). La supresión de la actividad de p110 γ mediante el uso de un inhibidor específico para esta isoforma mostró la reducción del número de células T CD4⁺ (especialmente las que presentan un fenotipo de memoria CD44^{high}, CD62L^{low}) y CD8⁺, células B y células T dobles negativas (CD4⁺CD8⁻). En paralelo los autores observaron la disminución de anticuerpos frente a ADN, la reducción en la formación de inmune-complejos y una mejoría de la patología renal en estos animales. Estos resultados señalan a p110 γ como una diana terapéutica en la enfermedad en ratón y hace necesario el estudio de su implicación en la patología humana para examinar su posible uso terapéutico (Barber et al., 2005b).

Presentación del trabajo

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre el papel que juegan las isoformas p110 δ y p110 γ de la clase I de PI3K en la patología humana del LES. La investigación se llevó a cabo en células obtenidas de sangre periférica de pacientes con esta enfermedad, centrándonos por una parte en el análisis de la vía PI3K/PKB en estas células y por otra en el análisis de las poblaciones de linfocitos T presentes en estos pacientes, así como en el estudio de sus posibles defectos en los mecanismos de tolerancia inmunológica. Finalmente analizamos el papel que puede tener la vía de PI3K/PKB en los mecanismos de tolerancia periférica afectados en estos pacientes, que hemos estudiado *in vitro*.

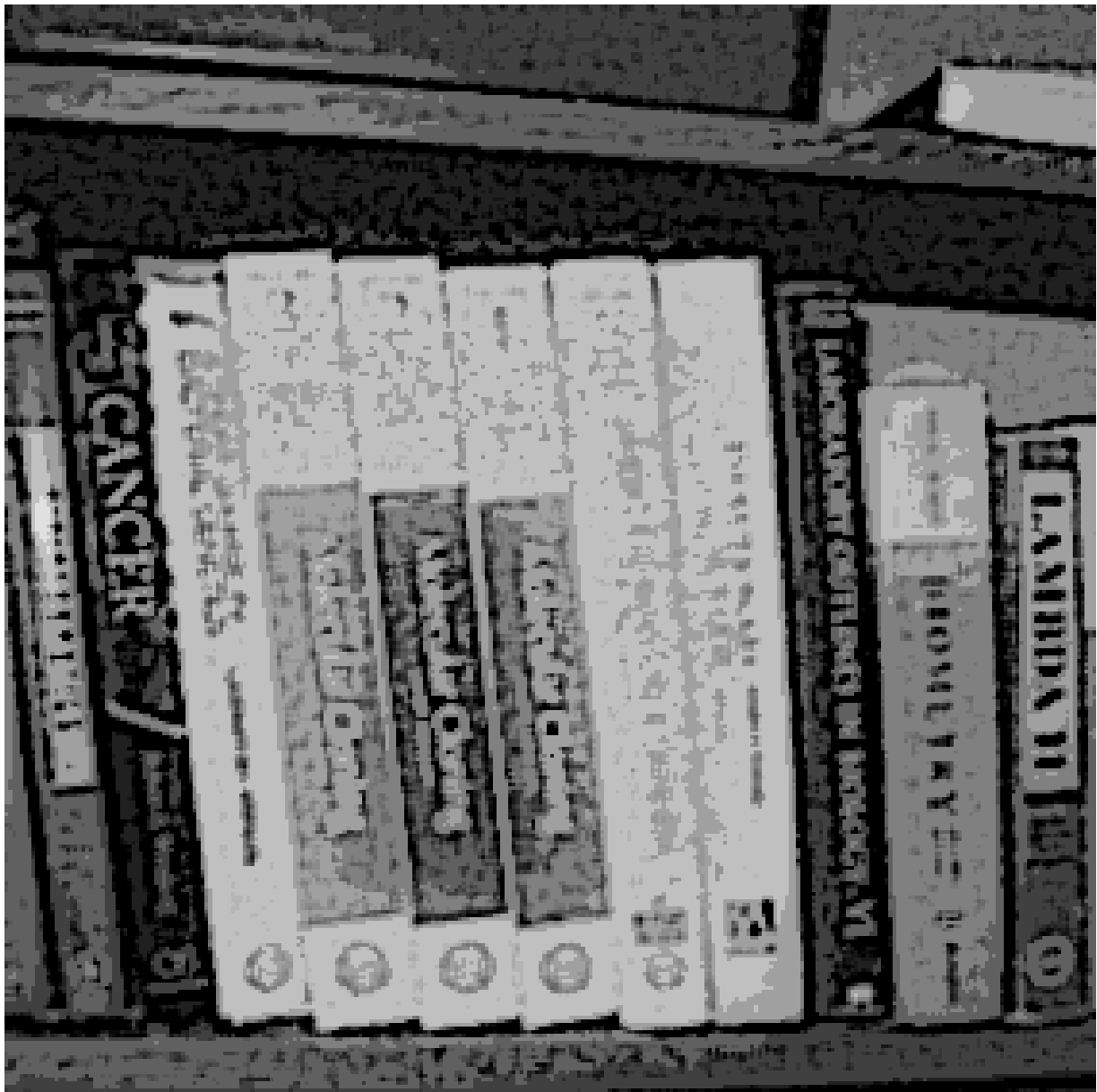
Objetivos



Objetivos:

- I. Determinar si la vía PI3K/PKB se encuentra activa en PBMCs y células T de pacientes con LES en comparación con éstas células procedentes de donantes sanos.
- II. Determinar la isoforma de PI3K responsable de la activación de la vía en estas células.
- III. Determinar la posible relación entre la activación de la vía de PI3K y las células T de memoria de pacientes con LES.
- IV. Determinar en nuestra población de pacientes que mecanismo o mecanismos de tolerancia periférica se encuentran alterados.
- V. Determinar si la inhibición de las isoformas p110 δ o p110 γ de PI3K dan lugar a la corrección del defecto de las células T frente al mecanismo de AICD.

Materiales y Métodos



Obtención de muestras

Se obtuvieron entre 5 y 10ml de sangre periférica en tubos con heparina sódica, de los pacientes seleccionados por los doctores colaboradores de los Hospitales La Paz, y el Hospital Ramón y Cajal. Los pacientes fueron previamente informados de las condiciones del estudio y se les dio a firmar un consentimiento informado al igual que los individuos control y los pacientes con artritis reumatoide, los cuales fueron reclutados en el hospital Ramón y Cajal. Los linfocitos de sangre periférica (PBMCs) fueron purificados en el laboratorio mediante un gradiente de Ficoll™ (HealthCare Bioscience). Las PBMCs, célula T y células Jurkat fueron cultivadas en medio RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con suero fetal de ternera (FCS, del inglés *fetal calf serum*) al 10%, L-Glutamina 2mM, Penicilina/Estreptomicina 100U/ml y HEPES 10mM, mientras que las células NIH-3T3 fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) al 10%, L-Glutamina 2mM, Penicilina/Estreptomicina 100U/ml y HEPES 10mM; en un incubador con el 5% de CO₂ y a 37°C.

Western Blot

Para realizar estos ensayos las células obtenidas del Ficoll™ fueron lavadas dos veces con PBS frío, congeladas en hielo seco y almacenadas a menos 80°C hasta el día del procesado. La purificación de células T se realizó como se describe en Alcázar et al., 2007. Para obtener el lisado total, las células (1x10⁶ a 2x10⁶) fueron incubadas en hielo con 150ml de buffer de lisis (1% TritonX-100, 5mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 2mM PMSF, 2mM EDTA, 10µg/ml de apoprotina y leupeptina y 2nM de ácido okadaico) durante 30min. Se centrifugó 15min. a 130000rpm. y 4°C. La concentración proteica fue medida mediante el uso del kit Micro BCA* Protein Assay Reagent (PIERCE). La electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 8-10%. La transferencia se realizó a membranas de nitrocelulosa (BioRad) y fueron incubadas con los anticuerpos anti-pPKB Ser⁴⁷³ (pPKB⁴⁷³), -pPKB Thr³⁰⁸ (pPKB³⁰⁸), -PKB, -p110α (C73F8), -p110β (C33D4) todos ellos de Cell Signaling, anti-PTEN, -p110γ (SC-7177; Santa Cruz Biotechnology) y anti-p110δ (ab1678, Abcam) Ab. Los anticuerpos secundarios unidos a HRP (del inglés *HorseRadish Peroxidase*) fueron de la casa comercial Dako. Las bandas de las proteínas fueron detectadas mediante el uso de ECL (Amersham Biosciences). La densitometría se realizó utilizando en el software ImageJ64.

Inmunoprecipitaciones y ensayos quinasas

Se utilizaron anti-CD28 (Biosource), anti-p110δ (ab32401, Abcam), anti-p110γ (Sigma), anti-Zap70 (Transduction Laboratories), y anti-FcεRIγ. Estos anticuerpos fueron utilizados en extractos totales de PBMCs tanto de individuos con LES como de controles sanos. Para los ensayos quinasas se utilizaron los anticuerpos p110δ (ab32401, Abcam), anti-p110γ (Sigma) y anti-Zap70 (Transduction Laboratories) .

Las inmunoprecipitaciones (IPs) fueron realizadas de forma seriada, primero p110 γ , seguido de p110 δ a partir de los sobrenadantes de la primera IP, o bien Zap70 como primera IP y p110 δ a partir del sobrenadante de esta primera IP. Para ello se partió de 200 μ g de lisado total de PBMCs obtenidas inmediatamente tras la purificación. Los inmunoprecipitados fueron resuspendidos en 45 μ l de HEPES 50mM con PI(4,5)P₂ (0.5mg/ml; Sigma-Aldrich). La reacción quinasa (volumen final de 50 μ l) fue iniciada al añadir 5 μ l del buffer quinasa 10X (10 μ Ci de ATP marcado con ³²P, 100mM MgCl₂, 200 μ M cold ATP). La reacción se incubó 25min. a 37°C y fue finalizada añadiendo 1mM HCl (100 μ l). Los lípidos fueron separados mediante la adición de metanol/cloroformo (1:1 v/v; 200 μ l) y se resolvieron en una placa de silica gel 60 (Merck), pretratada con oxalato potásico al 1%, utilizando una mezcla de ácido acético glacial/H₂O/*n*-propileno (4:31:65 v/v/v). Para la visualización de los productos radiactivos se utilizaron autorradiografías (Kodak) y para la cuantificación se utilizó el software ImageJ64; la actividad quinasa específica se calculó mediante la división de la intensidad de la señal de PIP₃ por la intensidad normalizada de la señal de la proteína determinada por WB en un extracto total de 50 μ g de las mismas muestras utilizadas para el ensayo quinasa.

Inmunofluorescencia

Se obtuvieron células T CD4⁺ con fenotipo naïve (CD45RA⁺ CD45RO⁻) o memoria (CD45RA⁻ CD45RO⁺) de las PBMCs obtenidas de pacientes y controles. Las PBMCs fueron lavadas dos veces con medio RPMI sin suero y resuspendidas en PBS-EDTA (1mM) para realizar la tinción extracelular. Para purificar células T CD4 naïve se realizó una tinción con anti-CD8 conjugado con PE y anti-CD45RO conjugado con FITC mientras que para las células T CD4 de memoria la tinción utilizada fue anti-CD8 conjugado con PE y anti-CD45RA conjugado con FITC. Se purificaron las células no marcadas mediante el aparato Epics Altra (Beckman Coulter). Se realizaron tinciones posteriores para evaluar el porcentaje de células CD8 y CD45RO o CD45RA que quedaban en las muestras aisladas obteniéndose porcentajes inferiores al 1%. Se contaron las células y se resuspendieron (5 x 10⁴/200 μ l) en RPMI con 50% del suero propio de cada individuo manteniéndolas 10min. a RT (tiempo en que se prepara toda lo necesario para el cytopspin) y se plaquearon en portaobjetos tapizados con Poly-L-lysine (Sigma) usando el cytopspin. Las células fueron fijadas en PBS-formaldehído al 4% (5min), se lavaron dos veces en PBS y se permeabilizaron con PBS-Triton X100 al 0,3%. El bloqueo se realizó con un buffer de PBS-Triton X100 al 0,01% que llevaba un 1% de BSA y un 10% de suero de cabra (especie de la que se obtuvieron los anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia). Las células fueron incubadas durante la noche a 4°C con anti-pPKB⁴⁷³ (Cell Signalling) y anti-CD3 ϵ (UCHT-1; eBioscience) o anti-CD19 (Santacruz Biotechnology). Tras dos lavados con PBS se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos AlexaFluor 488 para identificar pPKB⁴⁷³ y Cy3 para identificar CD3 ϵ o CD19. Como medio de montaje se utilizó PBS-Glicerol 33% al que se le añadió Hoechst 33258 (10 μ g/ml). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal utilizando el microscopio FluoView1000 (Olympus) o el Zeiss Axiovert LSM 510 (Zeiss, el cual tubo que usarse en

un experimento por avería del otro).

Citometría de flujo

Las PBMCs obtenidas por Ficoll™ se resuspendieron a concentración de $1 \times 10^6/\text{ml}$ en un buffer de tinción (PBS 1x + 0,5% FBS + EDTA) frío. Se añadieron las combinaciones de anticuerpos, que se describen a continuación (BecktonDickinson), en las cantidades adecuadas según la titulación previa de cada uno. Se incubaron 30min. a 4°C en oscuridad tras lo que se lavaron dos veces con buffer de tinción procediendo a su análisis en el citómetro. El citómetro de flujo utilizado fue el XL-CounterFacs de BecktonDickinson.

FITC	PE	PyC5
CD3	CD8	CD4
CD45RA	CD8	CD4
CD45RO	CD8	CD4
CD29	CD8	CD4
CD66+64b	CD19	CD3

Tabla V. Combinaciones de anticuerpos.

Plásmidos, transfecciones y electroporaciones

Los plásmidos pMT2-KD-p110 δ y pcDNA3.1-KR-p110 γ fueron donados por B. Vanhaesebroeck y M. Wymann respectivamente y subclonados en pEF-BOS XC (a ambos los hemos denominado KR). Los mutantes p110-caax se describe en Alcázar et al. 2007. Las células NIH-3T3, línea de fibroblastos de ratón, fueron obtenidas de ATCC y transfectadas mediante Lipofectamina™ Plus® (Invitrogen). Las células Jurkat, una línea celular de linfoma T PTEN-/-, fueron obtenidas de ATCC. Las condiciones de electroporación con los cADN fueron 290V y 975 μF utilizándose 5×10^6 células para cada electroporación.

Ensayos de anergia

Las PBMCs obtenidas por Ficoll™ fueron cultivadas 90min. con RPMI-1%BSA a 37°C y 5% CO₂ para dejarlas en un estado basal. Se recogieron las células del sobrenadante procurando no llevarse los monocitos pegados al plástico. 6×10^5 células por punto de estas células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI completo (RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-Glutamina 2mM, 100U/ml de Penicilina y Estreptomina, 10mM HEPES y 50mM de β -mercaptoetanol) a una concentración de

1x10⁶ células/ml plaqueándose en pocillos de una placa de 24, los cuales fueron previamente tapizados tal y como se indica en el protocolo de Hans Wolf (Wolf et al., 1994). A los cuatro días de cultivo en condiciones de 37° y 5% de CO₂ se añaden a cada pocillo 400µl de RPMI completo. A los siete días de cultivo las células fueron lavadas dos veces con RPMI completo y se replaquearon en pocillos sin tapizar a una concentración de 1x10⁶ células/ml cultivándose durante 24 horas. A las 24 horas se recogieron las células y se resuspendió cada pocillo en 800µl. Mediante azul Tripan se realizó un recuento del número de células vivas en la cámara de Neubauer y se plaquearon 1x10⁵ células/pocillo en un volumen de 100µl de RPMI completo en pocillos de una placa de 96 pocillos tapizados con UCHT-1 (0,1µg/pocillo) con o sin IL-2 (20U/ml). Se realizó la medida de proliferación a 72 horas por incorporación de timidina las últimas 72 horas por adición de 0,5µCi de timidina tritiada (25Ci/mmol; Amersham) por pocillo. A las 12 horas se recogieron las células y se lisaron en una membrana de fibra de vidrio (Wallac) con la ayuda de un Harvester (Perkin Elmer) tras lo que se realizaron las mediciones de las cuentas en un contador de centelleo líquido (Perkin Elmer) durante 1min. con un programa normalizado. Para el análisis se consideró en cada individuo la medida de proliferación con IL-2 como 100% y se calculó el porcentaje de la condición sin IL-2 en referencia a este control positivo.

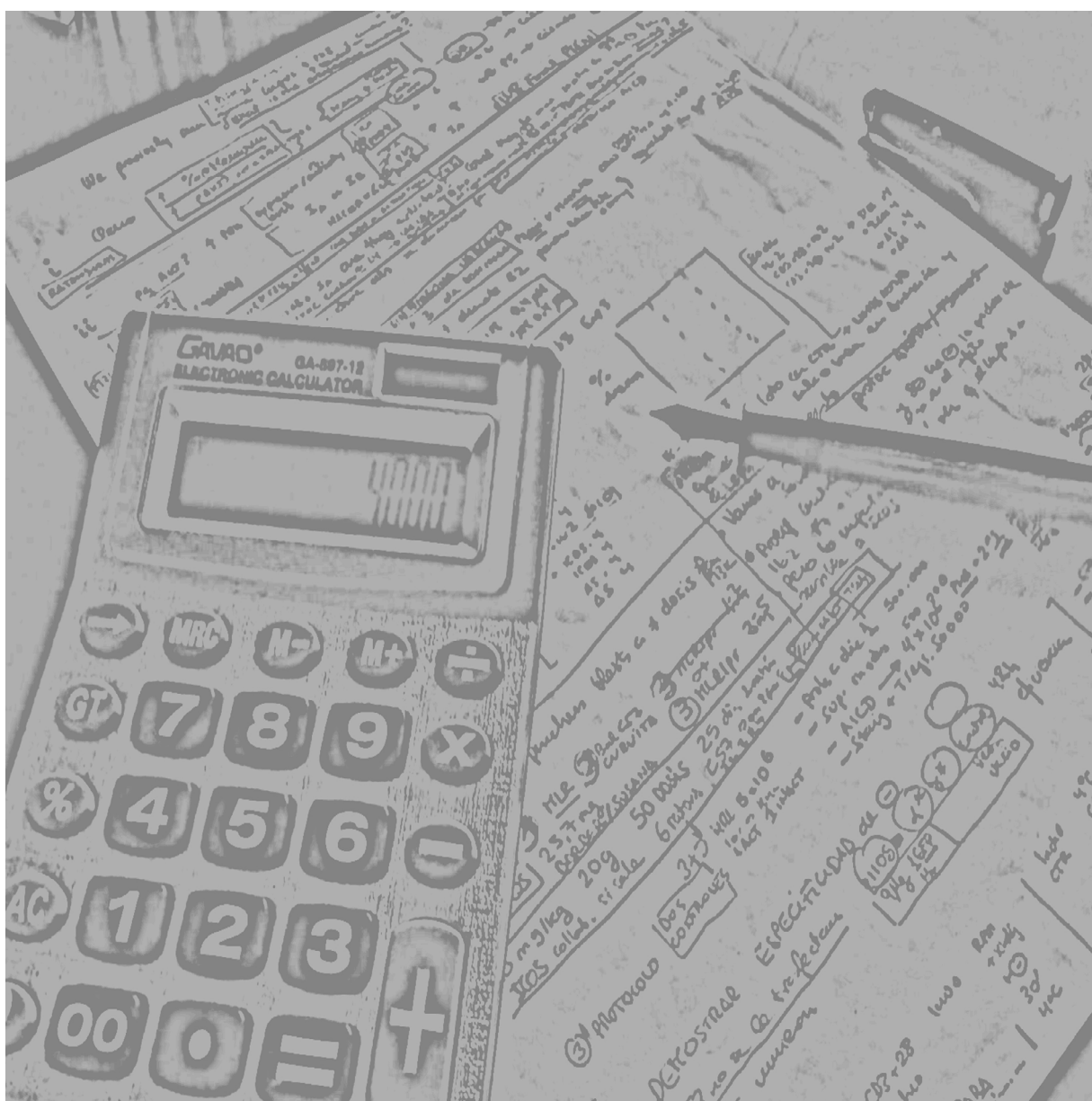
Ensayos de AICD y ACAD

Las células arrestadas se estimularon con fitohemaglutinina (PHA, del inglés *Phytohemagglutinin*, Gibco) 1ng/ml durante 3 días, a una concentración inicial de 1x10⁶ células/ml. A los tres días se lavaron las células para quitar el PHA y se resuspendieron en RPMI completo con 30U/ml de IL-2. El día 13 se lavaron las células y se resuspendieron en RPMI completo a una concentración de 1,5x10⁶ células/ml. Se plaquearon 1,5x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos, sin nada para la apoptosis espontánea o con 0,03µg/pocillo de anti-CD3 (OKT3, eBioscience) para los ensayos de AICD, por triplicado para cada condición. Al tercer día, 16 de experimento, se realiza la tinción de anexina-V/PI. La tinción se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit comercial (eBioscience). Los inhibidores fueron administrados cada 24h en un volumen de 50µl a una concentración adecuada para que las concentraciones fuesen las indicadas en los ensayos en un volumen final de 150µl. El cálculo de AICD se realizó mediante la siguiente fórmula: AICD = apoptosis inducida / apoptosis espontánea. En el caso de las células Jurkat, 24 horas tras la transfección fueron estimuladas en una placa de 96 pocillos con 0,5µg de anti-CD3 (UCHT-1) por pocillo (pegado al plástico) o sin nada (apoptosis espontánea) durante otras 24 horas, tiempo en el que se realizó la medición de anexina-V/PI. Los inhibidores Ly-294002 (Calbiochem), IC87114 (Calistogapharma) o AS252424 (Caymanchem) fueron resuspendidos en DMSO el cual se utilizó como control de vehículo. Estos inhibidores se renovaban cada 24h.

Estadística

En el análisis estadístico de los diferentes resultados se utilizaron los siguientes test estadísticos: el T de Student de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, para la comparación de medias entre dos grupos, con la corrección de Welch cuando fue necesario. Para la comparación del efecto de los tratamientos en los ensayos de AICD y proliferación de las células de los individuos control se utilizó el test Anova de una vía con la corrección de Dunnet. Para el análisis de correlaciones entre los valores de pPKB y las células de memoria se usó la correlación de Pearson. Finalmente las tablas de contingencia de los valores obtenidos del análisis de las inmunofluorescencias se analizaron mediante Chi-cuadrado. Todos los test se realizaron mediante el uso del programa estadístico GraphPad Prism V5.0.

Resultados



Resultados

I. Población de estudio

Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados por los doctores colaboradores en este estudio siguiendo un protocolo aprobado por el comité ético de La Paz (HULP: PI-529). Ochenta y ocho pacientes (20-58 años), que cumplían al menos 4 de los 11 criterios de clasificación indicados por el Colegio Americano de Reumatología, y 45 individuos sanos (24-55 años) fueron reclutados. Se utilizaron controles del mismo género que el paciente en la mayoría de los casos. Los pacientes se clasificaron como inactivos (SLEDAI < 4) o activos (SLEDAI \geq 4) y de acuerdo con su tratamiento como: no tratados, tratados con inmunosupresores no esteroideos (NSAID, del inglés non-steroid anti-inflammatory drugs; como son la azatioprina o la ciclofosfamida), tratados con prednisona, con prednisona más NSAID (azatioprina, ciclofosfamida, tacrolimus, micofenolato o hidroxicloroquina) o tratados con prednisona, NSAIDs o metotrexato. Los pacientes estuvieron un mínimo de 24 horas sin medicación antes de la extracción de sangre. Adicionalmente se examinaron 12 pacientes diagnosticados de artritis reumatoide.

Ensayo	Tratamiento	N° de pacientes examinados			
		Inactivos (n=21)		Activos (n=27)	
pPKB/PKB	No tratados	9		4	
	NSAID	2		2	
	Prednisona	4		2	
	Prednisona + NSAID	5		17	
	Prednisona + NSAID+Metotrexato	1		2	
Ensayo	Tratamiento	Inactivos (n=27)		Activos (n=28)	
Células T de memoria	No tratados	9		3	
	NSAID	2		3	
	Prednisona	5		5	
	Prednisona + NSAID	9		15	
	Prednisona + NSAID+ Metotrexato	2		2	
Ensayo	Tratamiento	Inactivos (n=0)		Activos (n=4)	
IF.	Prednisona	0		1	
	Prednisona + NSAID	0		3	
Ensayo	Tratamiento	Inactivos Proteína / Actividad (n=21/11)		Activos Proteína / Actividad (n=21/14)	
Actividad PI3K- δ	No tratados	9	7	1	0
	NSAID	0	0	3	2
	Prednisona	4	1	3	3
	Prednisona + NSAID	7	3	14	9
	Prednisona + NSAID+ Metotrexato	1	0	0	0
Ensayo	Tratamiento	Inactivos Proteína/ Actividad (n=24/11)		Activos Proteína / Actividad (n=16/10)	
Actividad PI3K- γ	No tratados	7	6	0	0
	NSAID	1	0	2	1
	Prednisona	5	3	4	3
	Prednisona + NSAID	10	2	10	6
	Prednisona + NSAID+ Metotrexato	1	0	0	0

Ensayo	Tratamiento	Inactivos (n=3)	Activos (n=2)
Anergia	No tratados	2	0
	Prednisona	1	0
	Prednisona + NSAID	0	2
Ensayo	Tratamiento	Inactivos (n=10)	Activos (n=5)

Tabla V. Pacientes.

II. Determinación del estado de PI3K en células de sangre periférica de individuos con Lupus Eritematoso Sistémico

Una de las características observadas en los modelos de LES en ratón, es la activación de la vía PI3K/PKB en las células del sistema inmunológico, y en especial en las células T CD4⁺ (Borlado et al., 2000b; Di Cristofano, 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003). La inhibición de la isoforma p110 γ da lugar a la mejora e incluso a la cura de la enfermedad, tanto en un modelo de ratón transgénico que presenta susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad como en otro modelo de ratón que presenta seis alelos de susceptibilidad más la pérdida del gen que codifica la molécula Fas (ratones MRL/lpr) y que también generan esta enfermedad (Barber et al., 2005a; Barber et al., 2005b).

El primer objetivo que se estableció en la presente tesis doctoral fue analizar si la vía de PI3K/PKB también se encuentra alterada en las células de la sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear cells*) y en linfocitos T de individuos con LES en comparación con los valores observados en las muestras de los donantes sanos.

II.I - Análisis de los niveles de fosforilación de PKB en células de sangre periférica de individuos con LES.

La activación de las PI3K de clase I en la membrana celular da lugar a la formación de PIP₃ (Fruman et al., 1998). Estos lípidos reclutan proteínas que contienen un dominio PH, entre ellas PKB que va a ser fosforilado entonces por PDK1 en el residuo Thr³⁰⁸ (Deane y Fruman, 2004) y por el complejo mTORC2-Rictor en el residuo Ser⁴⁷³ (Fig.3; Chua et al., 2009). El estado de fosforilación, y por lo tanto de activación, de PKB se considera así un parámetro que informa sobre la activación de PI3K (Cantrell, 2002).

La determinación de los niveles de fosforilación de esta proteína se realizó mediante la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos anti-pPKB⁴⁷³ y anti-PKB para determinar estas proteínas en lisados obtenidos de PBMCs de 48 pacientes y 30 individuos sanos utilizados como control. Se descartaron otras técnicas como la citometría de flujo, por falta de sensibilidad y fiabilidad en la medición de esta proteína intracelular. Los valores de los individuos control y paciente encajan dentro del rango de valores obtenidos en células T activadas a distintos tiempos con anti-CD3 y anti-CD28. Además se comprobó que los valores obtenidos con anti-pPKB⁴⁷³ y anti-pPKB³⁰⁸ tienen un comportamiento paralelo (Fig.5A). Tras esta comprobación se decidió utilizar el anti-pPKB⁴⁷³ por ser más limpio.

Los PBMCs obtenidos de sangre periférica de individuos con LES presentan niveles de fosforilación de la proteína PKB significativamente más altos que las de los individuos normales (X pPKB⁴⁷³/PKB \pm SEM = 3,2 \pm 0,4 en pacientes frente a 1,0 \pm 0,1 en controles, $p < 0,001$; Fig.5B y C). El análisis

de estos datos se completó mediante el estudio de la relación entre los niveles de pPKB⁴⁷³ y el estado de la enfermedad de los pacientes. Se observa que los niveles de fosforilación de PKB en PBMCs de individuos en estado activo son mayores que los de los individuos en estado inactivos (X pPKB⁴⁷³/PKB \pm SEM = $4,1 \pm 0,7$ en $n = 27$ individuos con SLEDAI ≥ 4 , frente a $2,0 \pm 0,4$ en $n = 21$ individuos con SLEDAI = 0–3; $p = 0,015$), siendo los niveles de ambos subgrupos mayores que los de los individuos control ($p < 0,001$ para la diferencia con respecto a los individuos en estado activo y $p = 0,04$ para la diferencia con respecto a los individuos en estado inactivo; **Fig.5C**). La representación de los tratamientos de los pacientes frente a sus niveles de pPKB muestra que no existe una relación entre estas variables (**Fig.5C**).

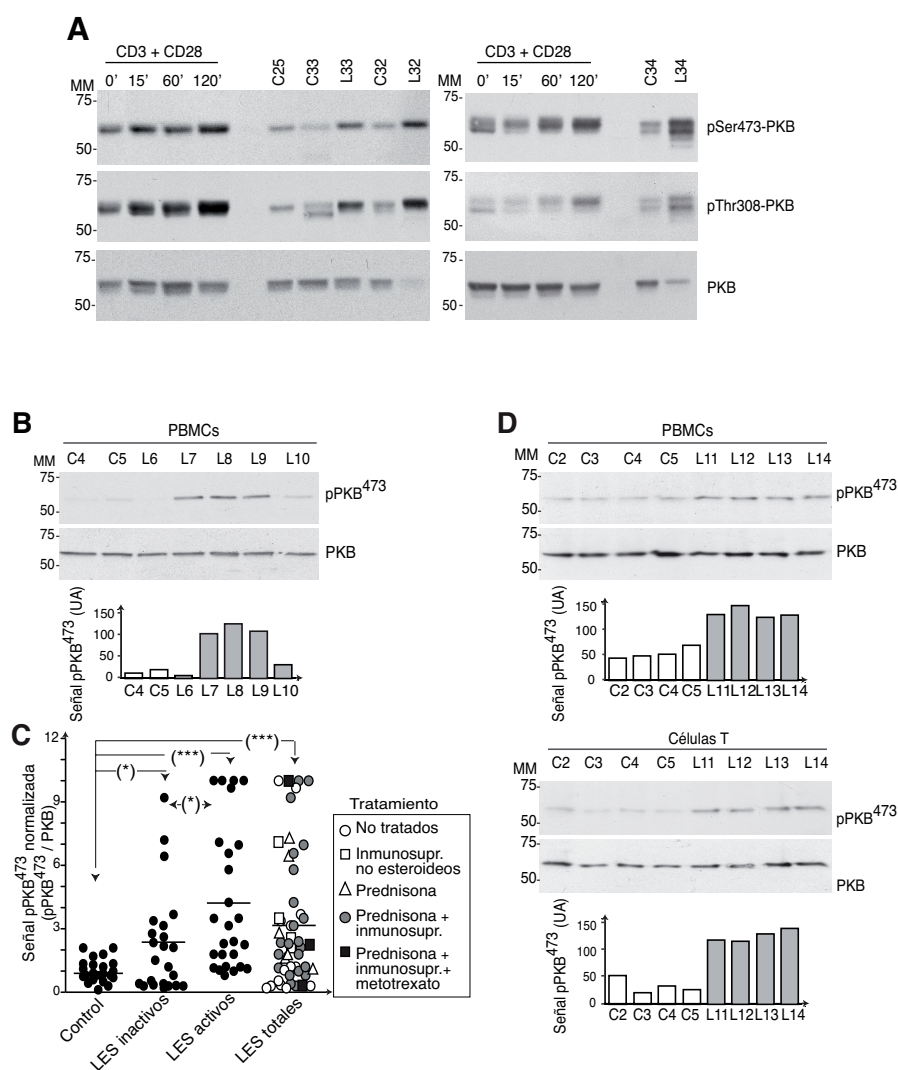


Figura 5. Los niveles de pPKB⁴⁷³ están elevados en PBMCs y células T de pacientes con LES.

(A). Inmunoblots de dos experimentos representativos donde se comparan los niveles de pPKB⁴⁷³ obtenidos en PBMCs de pacientes (L) y donantes sanos (C), tras su purificación, junto con los niveles de pPKB⁴⁷³ de las PBMCs de un donante sano estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante los tiempos indicados. Se muestra además que los residuos Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³ tienen niveles similares de fosforilación tanto en pacientes como en controles. (B) Inmunoblot representativo donde se muestra la cuantificación de las bandas de pPKB⁴⁷³ en unidades arbitrarias normalizadas con los niveles de PKB totales. La cuantificación se realizó mediante el uso del software ImageJ64. (C) Diagrama de puntos donde se representan todos los datos de la relación de pPKB⁴⁷³/PKB obtenidos de los pacientes con LES ($n = 48$) y donantes sanos ($n = 30$). En la columna del total de pacientes con LES, se han representado los valores con símbolos que representan los tratamientos que seguían en el momento en que se les extrajo la muestra, estos son: no tratados, tratados con antiinflamatorios no esteroideos (NSAID; azatioprina o ciclofosfamida), tratados con prednisona solamente, con prednisona y NSAIDs adicionales (azatioprina, ciclofosfamida, tacrolimus, micofenolato o hidroxicloroquina) o bien tratados con prednisona, NSAIDs y metotrexato. Los valores de los pacientes en estadio activo (SLEDAI ≥ 4) y de aquellos en estadio inactivo (SLEDAI < 4) se muestran también por separado. Los resultados fueron analizados mediante el uso del software GraphPad V5.0, se aplicó entre los distintos grupos un test de Student con la corrección de Welch. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$. (D) Inmunoblot representativo de experimentos ($n = 4$) en los que se comparó los niveles de pPKB de extractos de PBMCs con los de células T purificadas de los mismos pacientes.

En un pequeño número de individuos se pudieron aislar suficiente número de células CD4 para realizar WB de anti-pPKB⁴⁷³. Los niveles de fosforilación de PKB en las células CD4 procedentes de individuos con LES son mayores que en aquellas procedentes de los individuos control (Fig.5D). Actualmente otros grupos también han descrito esta alteración (Besliu et al., 2009).

II.II- La vía PI3K/PKB se encuentra activa tanto en células T CD4⁺ de memoria como en las células T CD4⁺ naïve de individuos con LES en fase activa.

Como el tamaño de muestra no permitía purificar suficiente número de células T naïve y de memoria para analizar pPKB por WB, decidimos teñir por inmunofluorescencia estos linfocitos, obtenidos por selección negativa a partir de PBMCs, con anti-pPKB⁴⁷³ para determinar la activación de la vía y con anti-CD3ε como marcador de la membrana celular. Tanto las células naïve (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) como las células con fenotipo de memoria (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺) de los individuos con LES ($n = 8$) muestran tinciones más intensas de pPKB que además se localiza en la membrana celular, mientras que en los individuos control ($n = 8$) esta tinción solo se aprecia en el núcleo y en valores menos intensos que en los individuos con LES (Fig.6).

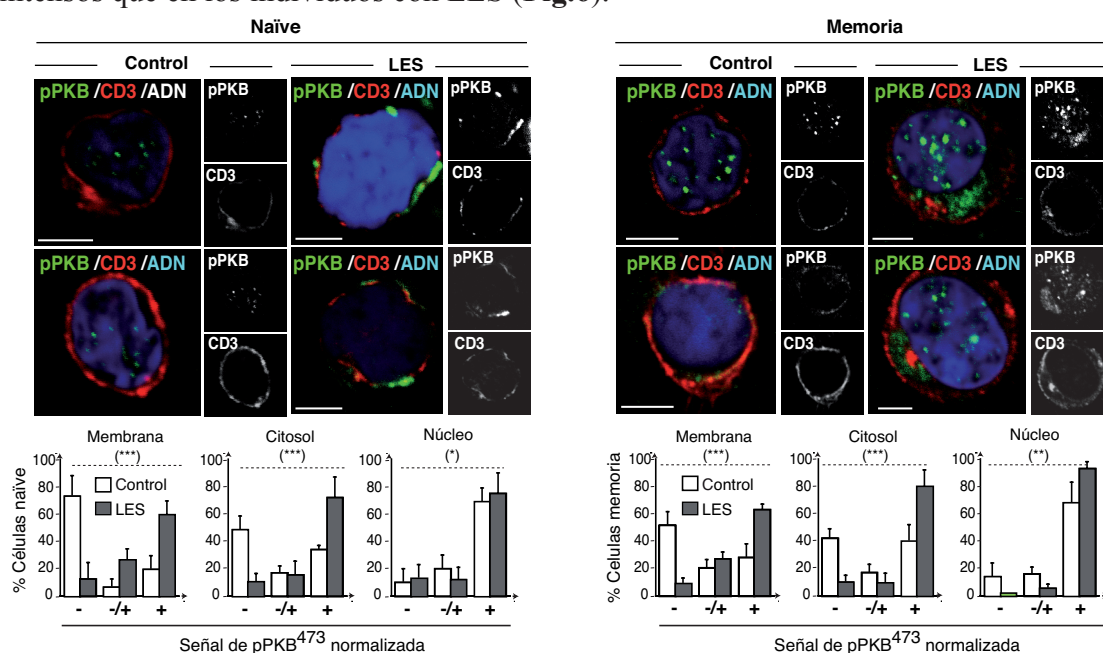


Figura 6. La ruta PI3K/PKB se encuentra activa tanto en células T naïve como en aquellas con fenotipo memoria/efector de individuos con LES en estadio activo.

Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células T CD4⁺CD45RO⁺ (memoria) o CD4⁺CD45RA⁺ (naïve) separadas por selección negativa de 8 pacientes en estadio activo y 8 controles sanos fueron teñidos con anticuerpos Hoechst 33258, anti-CD3 y -pPKB⁴⁷³. La señal de pPKB⁴⁷³ fue cuantificada con el uso de ImageJ y puntuada de la siguiente manera: 0 (<104 píxeles); ± (entre 104 y 4,5 x 10⁴) y + (≥4,5 x 10⁴ píxeles). Los gráficos de barra muestran el porcentaje de células englobados dentro de los distintos grupos en base a su señal de PKB para lo que separamos el análisis de la célula en 3 zonas: membrana, citosol y núcleo. Se representa la media ± el error estándar de los porcentajes de los 8 pacientes. Se tomaron un mínimo de 25 células por paciente. El análisis se realizó mediante el test de chi-cuadrado con el software GraphPad Prism V5.0. (*)P<0,05, (**)P<0,01, (***)P<0,001. Barras = 5µm.

También se realizó este análisis en células B. Para ello no se purificaron estas células sino que se plaquearon PBMCs sobre un portaobjetos tratado con L-polilisina y se identificaron utilizando el

marcador de membrana CD19. Aunque este estudio se realizó en muy pocas muestras, $n = 3$, se observa que la vía de PI3K en estas células de individuos con LES se encuentra más activa que en individuos normales, confirmando estudios de otros autores (Fig.7; Perl et al., 2010)

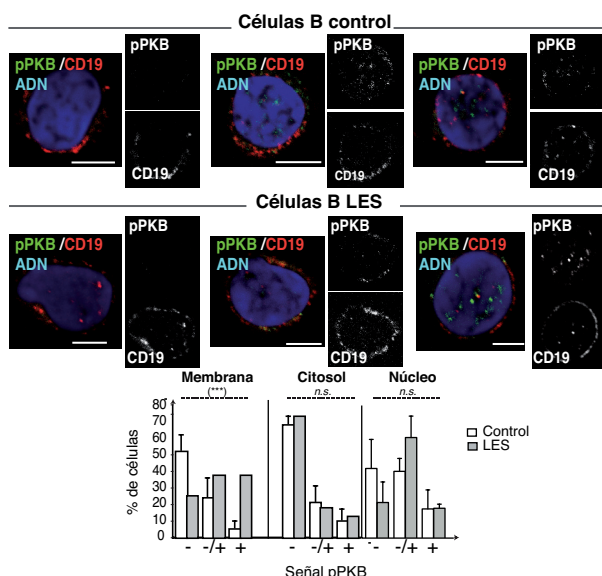


Figura 7. La ruta PI3K/PKB se encuentra activa en células B de individuos con LES en estadio activo.

Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de células B identificadas por CD19 en 3 y 3 controles. Estas células fueron además teñidas con anticuerpos Hoechst 33258 y pPKB⁴⁷³. La señal de pPKB⁴⁷³ fue cuantificada y analizada como en la Fig.6. (*) $P < 0,05$, *n.s.* = no significativo. Barras = 5 μ m.

II.III - Análisis de los niveles del principal regulador negativo de la ruta PI3K/PKB.

El principal regulador negativo de esta vía es la fosfatasa PTEN (Fruman y Cantley, 2002). Esta proteína se encarga de defosforilar el PI-3,4,5-P₃ generando PI-4,5-P₂, (Fig.3; Maehama y Dixon, 1998). Dado que se ha demostrado que la falta de uno de los alelos de esta proteína provoca en ratón una patología similar al LES humano (Di Cristofano et al., 1999), decidimos examinar los niveles de PTEN en lisados totales de PBMCs procedentes de individuos con LES y los comparamos con los de individuos control sanos.

La densitometría de las bandas obtenidas por WB no presentan diferencias significativas entre los niveles de expresión de esta proteína en ambos grupos de muestras (X PTEN/ β -actina \pm SEM = $0,9686 \pm 0,1795$ en $n = 7$ controles frente a $0,9846 \pm 0,2054$ en $n = 13$ pacientes con LES, $p = 0,96$; Fig.8).

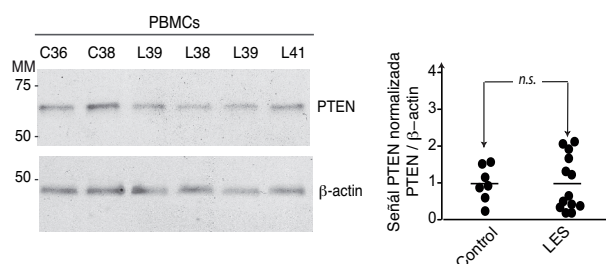


Figura 8. Los niveles de PTEN no se encuentran alterados en PBMCs de individuos con LES en comparación con las de individuos sanos.

(A) Inmunoblot representativo de un experimento en el que se evalúan los niveles de PTEN obtenidos de extractos de PBMCs procedentes de individuos con LES y control normalizándolos con los niveles de β -actina. Diagrama de puntos donde se representan los valores de la relación PTEN/ β -actina de pacientes ($n = 13$) y donantes sanos ($n = 10$). La cuantificación se realizó utilizando el software ImageJ64 y el análisis estadístico mediante GraphPad V5.0. Se aplicó un test de student para comparar las medias de los dos grupos. *n.s.* = no significativo.

II.IV - Análisis de los niveles de fosforilación de PKB en PBMCs de individuos con artritis reumatoide.

En el estudio se incluyó un grupo de 12 individuos diagnosticados de artritis reumatoide (AR), otra enfermedad autoinmune sistémica (McInnes y Schett, 2011), que comparamos con 10 controles sanos. Este análisis se realizó para evaluar si la activación de PI3K en células de sangre periférica es común a distintas enfermedades autoinmunes sistémicas, o si solo es propio de la enfermedad de LES. Como se muestra en la **Fig.9** no se observan diferencias en los niveles de fosforilación de la proteína PKB entre las PBMCs de individuos control y las PBMCs de los individuos con AR ($X \text{ pPKB}^{473}/\text{PKB} \pm \text{SEM} = 1,2 \pm 0,3$ en $n = 12$ pacientes frente a $1,1 \pm 0,2$ en $n = 10$ controles, $p = 0,78$).

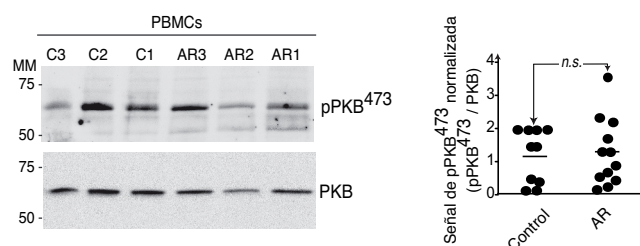


Figura 9. Los niveles de pPKB⁴⁷³ en PBMCs de pacientes con artritis no muestran diferencias comparados con los de los individuos control.

Inmunoblot representativo de los niveles de pPKB⁴⁷³ y PKB y diagrama de puntos donde se representan los datos de pPKB⁴⁷³ normalizados con PKB obtenidos de ambos grupos, individuos control (C; $n = 10$) y pacientes con artritis reumatoide (AR; $n = 13$). Los resultados fueron analizados mediante el uso del software GraphPad V5.0, se aplicó entre los distintos grupos un test de student para comparar las medias de los dos grupos. *n.s.* = no significativo.

III. Determinación de la isoforma “hematopoyética” responsable de la actividad PI3K en células de sangre periférica de individuos con Lupus Eritematoso Sistémico

Tras determinar que la vía de PI3K/PKB se encuentra activa en las células de sangre periférica de individuos con LES, y discriminar que esta actividad no se debe a la ausencia de PTEN, nos propusimos analizar cual o cuales eran las isoformas de PI3K responsables de esta actividad. La hipótesis de partida fue, en base a los trabajos previos en ratón (Barber et al., 2005a; Barber et al., 2005b), que p110 γ sería la isoforma responsable, ya que en estos modelos la ausencia o inhibición de p110 γ reduce o impide la enfermedad.

III.I. - La actividad de PI3K en PBMCs de individuos con LES es debida a la isoforma catalítica p110 δ .

Para su determinación se realizaron ensayos lípido quinasa *in vitro* en inmunoprecipitados obtenidos a partir de lisados de PBMCs de individuos sanos e individuos con LES con anticuerpos específicos para las isoformas p110 γ y p110 δ de manera secuencial (Jiménez et al., 2002).

La actividad específica de p110 γ es ligeramente menor en PBMCs procedentes de individuos con LES que en los donantes sanos, lo que se observa tanto en individuos en estadio activo como en estadio inactivo (**Fig.10B y C**). Tampoco se observan variaciones en los niveles de ésta proteína entre los distintos grupos (**Fig.10A y C**).

Sin embargo, la actividad específica y la total de la isoforma catalítica p110 δ es mayor en extractos de individuos con LES en comparación con los de los controles (X actividad p110 δ / cantidad proteína p110 δ \pm SEM = $0,9154 \pm 0,1931$ en $n = 13$ en individuos control frente a $3,018 \pm 0,5719$ en $n = 25$ en individuos con LES; $p = 0,0016$). Cuando realizamos la comparación entre las dos subpoblaciones de individuos con LES y los individuos control, ambos presentan mayor actividad de esta isoforma y, aunque no de manera estadísticamente significativa, los individuos en estadio activos presentan mayor actividad que los individuos en estadio inactivo ($1,949 \pm 0,5874$ en $n = 11$ individuos en estadio inactivo con una $p = 0,04$ con respecto a los controles y $3,858 \pm 0,8640$ en $n = 14$ individuos en estadio activo con un $p = 0,0018$ respecto a los controles. La p entre ambos subgrupos es de 0,1; **Fig.10B y C**). La cantidad de p110 δ en los individuos con LES son menores que en los individuos control (X señal de p110 δ / β -actina \pm SEM = $100,2 \pm 5,253$ en $n = 28$ en individuos control frente a $77,50 \pm 5,220$ en $n = 42$ en individuos con LES, $p = 0,0047$; **Fig.10A y C**) y esto sucede también en ambas subpoblaciones (X señal de p110 δ / β -actina \pm SEM = $80,78 \pm 6,801$ en $n = 21$ individuos en estadio inactivo con una $p = 0,03$ con respecto a los controles y $73,9 \pm 8,111$ en $n = 21$ individuos en estadio activo con un $p = 0,0067$ respecto a los controles, $p = 0,5$; **Fig.10A y C**).

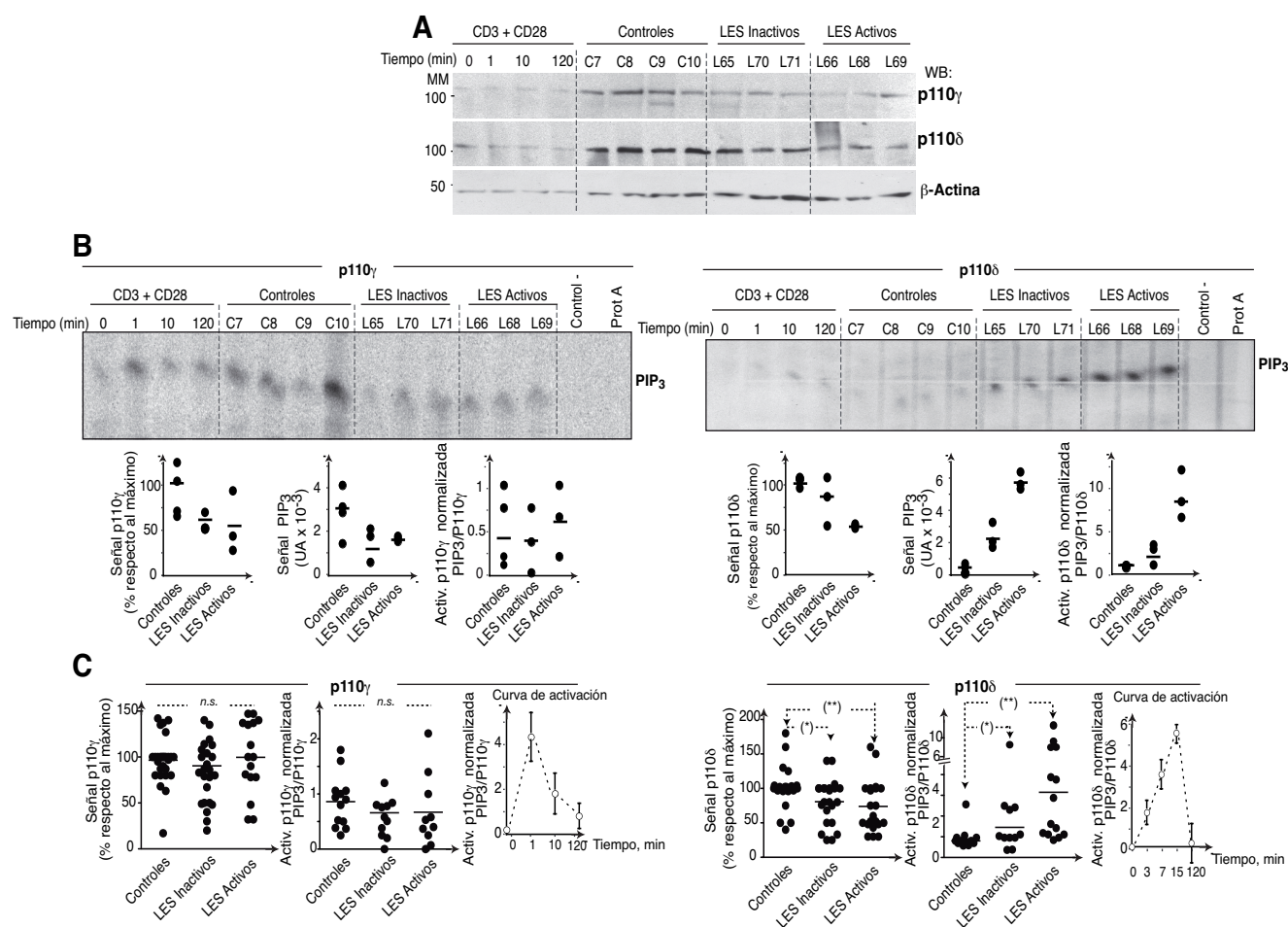


Figura 10. Las PBMCs de los individuos con LES presentan mayor actividad de p110 δ que las de los donantes control.

(A) Inmunoblot representativo de los niveles de p110 γ , p110 δ y β -actina en PBMCs obtenidos de pacientes (L), activos e inactivos, y controles (C) utilizados para analizar la actividad PI3K. Se utilizaron 50 μ g para evaluar los niveles de proteína y 200 μ g para las inmunoprecipitaciones con anticuerpos específicos anti-p110 δ y anti-p110 γ con los que se realizaron los ensayos PI3K. Como positivo se utilizaron células arrestadas 90min. en medio sin suero con BSA y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 durante los tiempos indicados. (B) Ejemplos de autorradiografías obtenidas de los ensayos quinasas. Los gráficos de puntos muestran los valores de la densitometría obtenida de los WB de proteína normalizados con β -actina, de las autorradiografías de los ensayos quinasas y de la relación entre ambas, PIP₃/p110 normalizada. (C) Los gráficos de puntos muestran todos los valores de los niveles de p110 γ o δ normalizados con respecto a β -actina, los valores de la relación entre el PIP₃ obtenido de las inmunoprecipitaciones de p110 γ o p110 δ y los niveles normalizados de estas proteínas (PIP₃/p110), y la media de los valores obtenidos de la curva de activación. La densitometría se realizó mediante el uso de ImageJ64 y el análisis estadístico igual que en la Fig.5. (*)P<0,05, (**)P<0,01, (***)P<0,001, n.s. = no significativo.

III.II - La actividad de PI3K en células T de individuos con LES es debida a la isoforma catalítica p110 δ .

El tamaño de muestra biológica del que partíamos no permitía la purificación de células T suficiente como para realizar ensayos quinasas específicos de las proteínas obtenidas de estas células mediante la inmunoprecipitación de p110 δ . Por ello buscamos receptores o moléculas de expresión mayoritaria en células T que asociaran p110 δ para poder ensayar la actividad lípido quinasas asociada en una inmunoprecipitación de dicha molécula. Probamos varias moléculas tales como Fc ϵ RI γ , CD3 ζ , CD28 y Zap70 relacionadas con PI3K (Tanemura et al., 2009; Okkenhaug et al., 2004; da Silva et al., 1997). De ellas la que muestra una mayor inmunoprecipitación asociada de p110 δ es Fc ϵ RI γ , molécula

que se expresa en células T de individuos con LES pero no en las de individuos sanos, además es expresada en otros leucocitos invalidándola como representativa de células T. Nos decidimos finalmente por Zap70, que se expresa mayoritariamente en células T (Chan et al., 1994) y da una buena señal de p110δ en inmunoprecipitados a partir de lisados de células Jurkat, casi no se observándose señal de las otras isoformas (**Fig.11A**). Evaluamos la actividad lípido quinasa asociada a inmunoprecipitados de Zap70 obtenidos de un pequeño número de lisados de PBMCs de pacientes con LES y controles sanos. Tal y como se muestra en la **Fig.11B** la señal lípido quinasa asociada a los inmunoprecipitados de Zap70 obtenidos de individuos con LES es mayor que la obtenida de controles sanos, no observándose diferencias en los niveles de expresión de esta proteína entre ambos grupos.

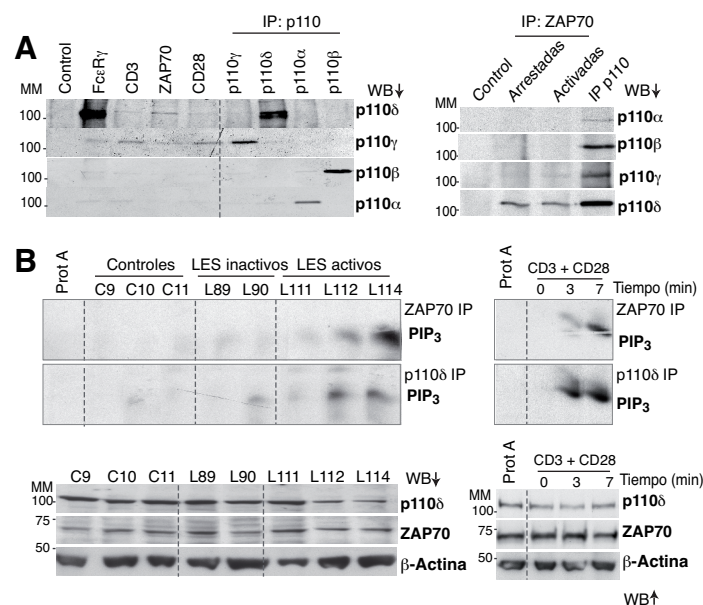


Figura 11. La actividad p110δ se encuentra elevada en células T de individuos con LES en comparación con las de los donantes sanos.

(A) WB representativo de p110δ y p110γ coimmunoprecipitadas con varios anticuerpos específicos de diferentes receptores o anti-Zap70 de extractos de PBMCs activadas durante 5min. con PHA. El panel de la derecha muestra los niveles de las distintas isoformas de p110 coimmunoprecipitadas con Zap70. (B) Ejemplos de autorradiografías de los ensayos quinasa realizados en inmunoprecipitados de Zap70 y p110δ (se inmunoprecipitó primero Zap70 y después p110δ) El WB muestra los niveles de proteína en los extractos totales de las muestras.

IV. Análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica de pacientes con LES y determinación de posibles relaciones con la activación de PI3K.

En los modelos de mamífero inferior de lupus anteriormente citados, en los que la vía de PI3K se encuentra activa, se observa en general un incremento del número de células CD4, y también de células B, las cuales presentan un fenotipo de célula memoria/efectora (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001). Por ello, en paralelo al estudio de los niveles de la fosforilación de PKB en los linfocitos de los individuos con LES, estudiamos por citometría de flujo los porcentajes de las distintas poblaciones celulares obtenidas por gradiente de Ficoll a partir de la sangre de los distintos donantes, centrándonos en especial en los subtipos de células T.

IV.I - Alteración de la relación CD4/CD8 en individuos con LES.

El análisis de las poblaciones generales muestra un pequeño incremento, pero no estadísticamente significativo, en el porcentaje de células B ($X\%CD19^+ = 6,83 \pm 0,43$ en $n = 29$ individuos control frente a $8,58 \pm 0,91$ en $n = 41$ individuos con LES con una $p = 0,08$; **Fig.12**). Estas células fueron identificadas con el marcador CD19, una glicoproteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada principalmente en células B (Clark y Lane, 1991).

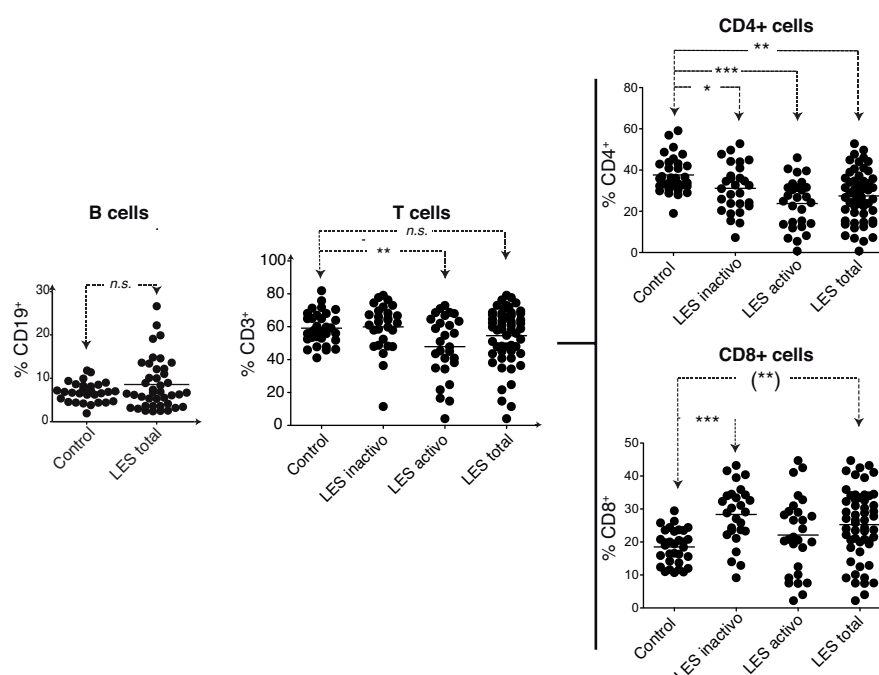


Figura 12. Aumento de la población de células T CD8 y reducción de las CD4 en pacientes con LES.

Los diagramas de puntos muestran los porcentajes de células B (CD19⁺) y T (CD3⁺) así como de las subpoblaciones de CD8⁺ y CD4⁺. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software GraphPad Prism V5.0 aplicando un test de Student con la corrección de Welch cuando era requerido. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (***) $P < 0,001$, n.s. = no significativo.

Con respecto a las células T, identificadas como células CD3 ϵ ⁺ (Dutton et al., 1998), no se observan diferencias entre los individuos sanos y los LES, sin embargo sí encontramos una reducción en el porcentaje de estas células en el subgrupo de estos individuos en estadio activo comparado con los donantes control ($X\%CD3^+ \pm SEM = 59,11 \pm 1,7$ en $n = 32$ controles frente a $47,86 \pm 3,9$ en $n = 55$ individuos con LES, $p = 0,007$; **Fig.12**). Al estudiar los subtipos de estas células, las células CD4⁺ y las células CD8⁺ (Dutton et al., 1998), sí se ven alteraciones en los porcentajes de células entre las poblaciones de individuos control y el total de la muestra de LES. En el caso de las células T CD4⁺ se observa una reducción del porcentaje ($X\%$ total de CD3⁺CD4⁺ $\pm SEM = 37,63 \pm 1,54$ en $n = 32$ individuos control frente a $27,82 \pm 1,613$ en $n = 55$ individuos con LES con una $p < 0,0001$; **Fig.12**). Esta disminución se aprecia tanto en los individuos con LES en estadio inactivo ($32,02 \pm 2,071$ en $n = 27$ individuos, $p = 0,0164$) como en aquellos en estadio activo ($23,78 \pm 2,236$ en $n = 28$ individuos; $p < 0,0001$). Las células T CD8⁺, por el contrario, muestran un aumento de su porcentaje ($X\%$ total de CD3⁺CD8⁺ $\pm SEM = 18,50 \pm 0,92$ en $n = 32$ individuos control frente a $25,26 \pm 1,452$ en $n = 55$ individuos con LES con una $p = 0,0004$; **Fig.12**) Esto ocurre de manera estadísticamente significativa en los individuos clasificados en estadio inactivo ($28,34 \pm 1,856$ en $n = 27$ individuos, $p < 0,0001$) pero no en aquellos en estadio activo, en los cuales se aprecia un aumento pero no es significativo de manera estadística ($22,11 \pm 2,194$ $n = 28$, $p = 0,14$).

IV.II - Los individuos con LES presentan un mayor porcentaje de células T con fenotipo de memoria que los individuos sanos.

En los modelos de ratón en los cuales la vía de PI3K está activa, se observa que las células CD4 que se acumulan muestran un fenotipo memoria/efector (CD62L^{low}CD44^{high}; Borlado et al., 2000a; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003). Artículos previos muestran una alteración en la relación de células T naïve (CD45RA⁺) y células T con fenotipo memoria/efector (CD45RO⁺) en pacientes de LES (Fritsch et al., 2006). Para confirmar este dato y comprobar si esta alteración tiene relación con la actividad PI3K/PKB se estudiaron 54 individuos con Lupus, 26 en estadio inactivo y 28 en estadio activo, y 31 individuos sanos en el mismo rango de edad (20-56 años). Para el análisis de las poblaciones celulares se usó nuevamente la técnica de citometría de flujo de tres colores. Estos estudios muestran que el porcentaje de células T de memoria en sangre periférica en individuos con LES es significativamente más alto que en individuos control. Esto se observa en células CD4 ($X\%CD4^+CD45RO^+ \pm SEM = 40,2 \pm 2,1$ en $n = 31$ en individuos control frente a $53,95 \pm 2,3$ en $n = 54$ en individuos con LES, $p < 0,0001$) en ambos subtipos de pacientes, tanto en aquellos con SLEDAI < 4 ($47,39 \pm 3,0$ en $n = 26$ individuos, $p = 0,048$ respecto al control) como en los individuos con SLEDAI ≥ 4 ($61,26 \pm 2,8$ en $n = 28$ individuos, $p < 0,0001$). Y también en células CD8 ($X\%CD8^+CD45RO^+ \pm SEM = 21,89 \pm 1,8$ en $n = 31$ en individuos control frente a $38,34 \pm 2,8$ en $n = 54$ en individuos con LES, $p < 0,0001$), y nuevamente en ambos subtipos de pacientes, en individuos inactivos ($36,84 \pm 3,856$ en $n = 26$, $p = 0,0012$) y en individuos activos ($40,64 \pm 4,194$ en $n = 28$ pacientes, $p = 0,0002$; **Fig.13**).

Adicionalmente utilizamos otro marcador de células T de memoria, la integrina- $\beta 1$, denominado CD29 (Tan et al., 2002). Los resultados obtenidos con este marcador son muy similares a los obtenidos con CD45RO salvo que se pierde la diferencia dentro de las células CD4 entre individuos en fase activa e inactiva.

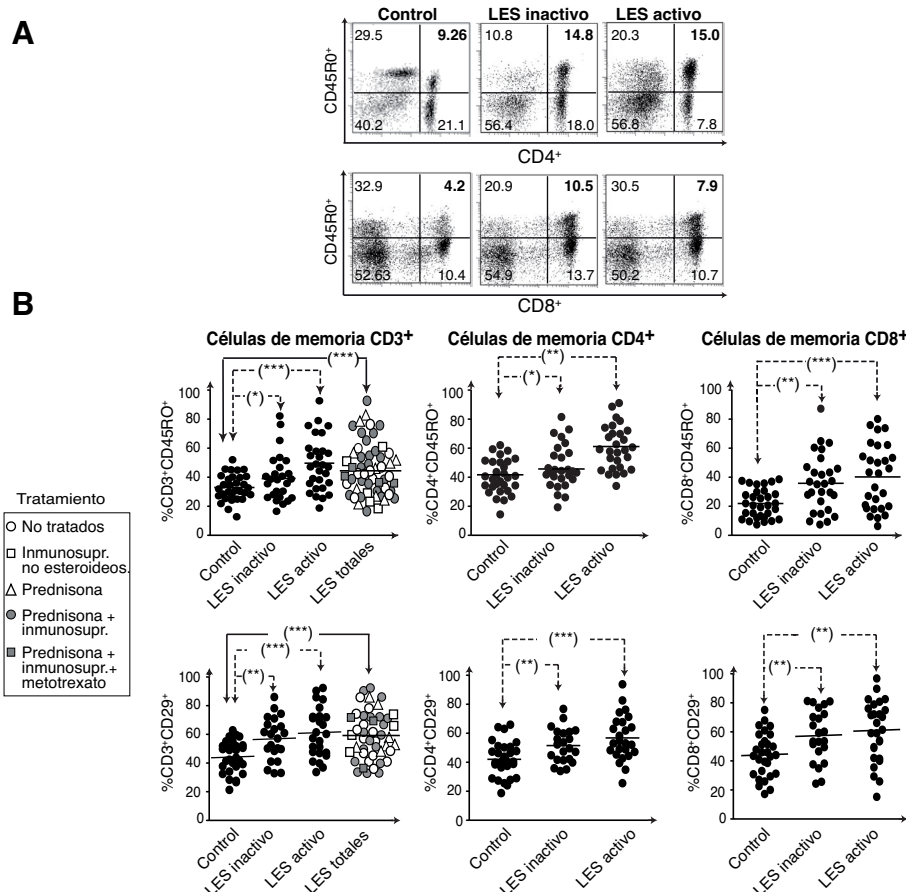


Figura 13. Aumento de la población de células T de memoria, tanto CD4 como CD8 en pacientes con LES.

(A) Ejemplos de gráficas de puntos obtenidas del citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL en los que se analizaron los porcentajes de células de memoria (CD45RO⁺) en células CD4⁺ y CD8⁺ de individuos control y pacientes con LES tanto en estadio inactivo como en activo. (B) Diagramas de puntos donde se representan los valores de los porcentajes de células CD45RO⁺ o CD29⁺ en células CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con LES ($n = 54$) y controles ($n = 31$). El análisis estadístico se realizó como en la Fig. 12.

El análisis del número de células totales, no muestra diferencias entre el número de células CD4 de memoria entre individuos con LES y controles sanos ($X \text{ num. CD4}^+ \text{ CD45RO}^+ \pm \text{SEM} = 14,429 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ en $n = 54$ individuos con LES frente a $15,26 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$ en $n = 31$ individuos control con una $p = 0,546$; **Fig. 14**) pero sí en el número de células CD8⁺CD45RO⁺ ($X \text{ num. CD8}^+ \text{ CD45RO}^+ \pm \text{SEM} = 10,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ en $n = 54$ individuos con LES frente a $4,0 \pm 0,4$ en $n = 31$ individuos con una $p < 0,0001$; **Fig. 14**).

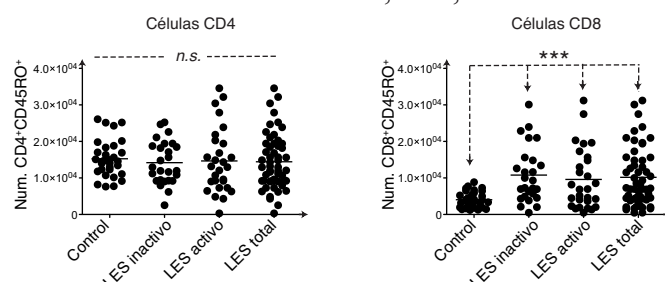


Figura 14. Número de células de memoria

Su cálculo fue realizado mediante la aplicación de la fórmula $\text{Núm.} = ((100,000 \times \% \text{CD3}^+ \text{CD4}^+) / 100) \times \% \text{CD4}^+ \text{CD45RO}^+$). El análisis estadístico se realizó como en la Fig. 12.

IV.III - Existe una correlación positiva entre la relación de células T CD4⁺ de memoria/naïve y los niveles de pPKB en individuos en fase activa de la enfermedad.

La relación entre células CD4 de memoria y naïve muestra una correlación positiva y estadísticamente significativa con los niveles de pPKB⁴⁷³ de los individuos en fase activa (Fig.15A) mientras que en los individuos inactivos y control no existe esta correlación, que tampoco se observa en las células CD8 (no mostrado), a pesar de que la relación memoria/naïve es más alta en ambos tipos de células, de los dos subtipos de pacientes, que en las de los individuos control sanos (Fig.15B).

El análisis no mostró relación entre los niveles de pPKB⁴⁷³ y el número de células T CD8 (no mostrado). Sin embargo, si encontramos una relación positiva entre los niveles de pPKB⁴⁷³ y el número de células CD4 de memoria en los individuos con LES (Fig.15C).

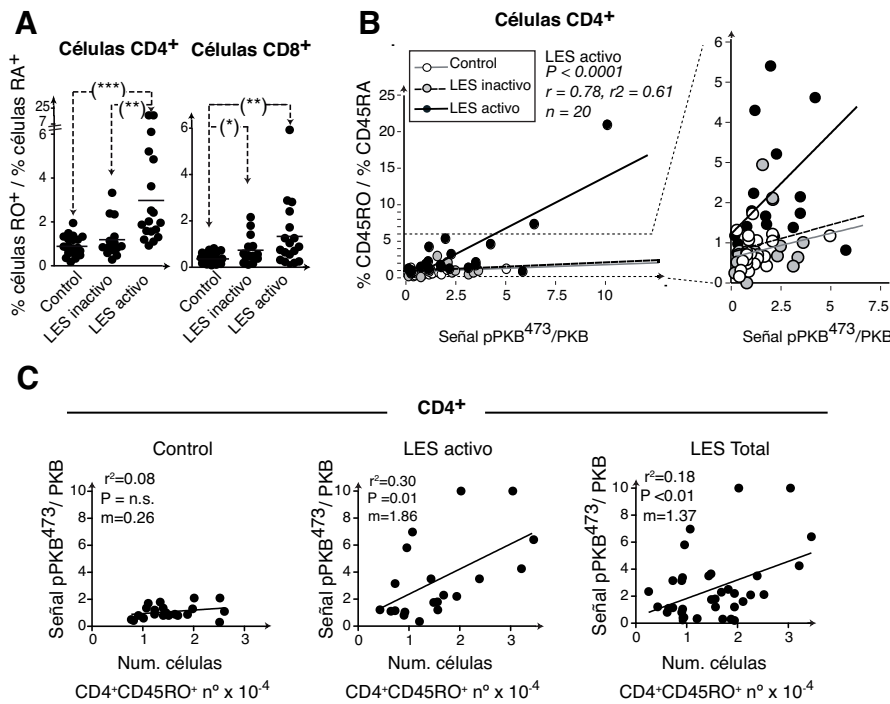


Figura 15 Alteración en la proporción de células con fenotipo memoria/efector y células naïve en células con LES.

(A) Relación de porcentajes de células CD45RO⁺/CD45RA⁺ en células T CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con LES y controles. La estadística fue realizada como en la Fig.13 (*) $P<0,05$, (**) $P<0,01$. (B) Diagrama de dispersión donde se representan los valores de la relación de células CD45RO⁺/CD45RA⁺ en células T CD4⁺ frente a los valores de pPKB⁴⁷³ de esos pacientes o controles; 36 pacientes con LES y 21 controles. Se adjunta una ampliación de los ejes para ver la distribución de la mayoría de los puntos. La estadística fue realizada con el software GraphPad Prism V5.0 y se aplicó el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson.

V. Análisis de los mecanismos de tolerancia periférica en células T de sangre periférica de pacientes con LES

En la literatura científica se han descrito la alteración de varios mecanismos de tolerancia periférica en las células T de individuos con LES., tanto a nivel molecular como a nivel celular. El siguiente objetivo fue evaluar si estos mecanismos también se encuentran alterados en nuestra población de estudio. Se seleccionaron los mecanismos de anergia, apoptosis autónoma de las células activadas, y la apoptosis inducida por activación por ser mecanismos intrínsecos a las células T que tienen relación con la vía PI3K/PKB (Fathman y Lineberry, 2007; Liu et al., 2003).

V.I - El mecanismo de anergia no esta alterado, bajo nuestras condiciones experimentales, en nuestra población.

La *anergia* es un mecanismo de tolerancia periférica de células T naïve. El reconocimiento de un antígeno sin la presencia de moléculas coestimuladoras, va a desencadenar una señalización intracelular que desemboca en un estado en el que la célula se divide un pequeño número de veces, dos o tres veces, pero no es capaz de responder a los estímulos externos ni desarrollar una respuesta inmunológica frente a dicho antígeno (**Fig.2**; LaSalle et al., 1994).

Para evaluar este mecanismo se utilizó un protocolo clásico descrito en 1994 por Hans Wolf (Wolf et al., 1994). Se basa en la incapacidad de las células T anérgicas de proliferar en presencia de una señal activadora, estímulo vía TCR con un anticuerpo anti-CD3 ϵ . En estos ensayos no se observan diferencias entre LES y los donantes sanos ($X\%$ relativo de proliferación \pm SEM = $5,896 \pm 5,461$ $n = 5$ frente a $9,480 \pm 7,420$ $n = 5$ respectivamente, con una $p = 0,7$). Como control interno se utilizaron las mismas condiciones, pero añadiendo IL-2 ya que se sabe que esta citoquina es capaz de revertir el defecto de proliferación *in vitro* (**Fig.16**).

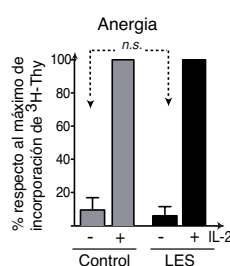


Figura 16. Las células T de pacientes con LES no son capaces de proliferar tras la inducción de anergia.

Se sometieron PBMCs de individuos con LES y donantes sanos a un protocolo de inducción de anergia (Wolf et al., 1994). El diagrama de barras muestra la media \pm SEM de los valores de proliferación (incorporación de timidina tritiada) obtenidos de 5 pacientes y 5 controles, en 5 experimentos independientes. Los valores fueron normalizados respecto al valor de la condición CD3+IL-2, condición que revierte el estado de anergia y permite la proliferación de las células, que fue considerado como el 100% para cada individuo en cada experimento (valor en % = (valor CD3/valor CD3+IL-2)*100). Para el análisis estadístico se aplicó un test de Student para comparar las medias de las condiciones “anti-CD3” de ambos grupos. *n.s.* = no significativo.

V.II - El mecanismo de la apoptosis inducida por activación esta alterado en las células T de pacientes con LES.

Otros de los mecanismos de tolerancia periférica más importantes son la ACAD y la AICD. Estos mecanismos van a jugar su papel tras la fase de expansión clonal cuando el compartimento de células T tiene una fase de reducción de la población previamente expandida, lo que permite el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. El mecanismo principal, como se ha explicado en la introducción, es la ACAD, anteriormente conocido como muerte por privación de citoquinas. Este mecanismo es independiente de TCR, pero depende de PI3K/PKB en cuanto a que esta vía es activada por las citoquinas del ambiente. En ausencia de citoquinas la vía antiapoptótica de PI3K/PKB, y otras, debería de *apagarse* mientras se activan vías proapoptóticas, como la de liberación del citocromo C, con lo que las células deberían de morir. Por su parte la AICD es un mecanismo dependiente de la re-estimulación vía TCR y de muchos factores tanto intrínsecos como extrínsecos, destacando la participación de las molécula Fas y su ligando FasL. Es fundamental en la eliminación de células autoinmunes (**Fig.2**; Brenner et al., 2008).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de apoptosis autónoma de las células T de los individuos con LES en comparación con estas células de los individuos control sanos aunque sí parece un poco mayor (**Fig.17A**). Sin embargo, la re-estimulación con anti-CD3 ϵ de las células T de individuos con LES, previamente activadas con PHA y cultivadas con IL-2, provoca niveles significativamente menores de AICD en comparación con los individuos control (X anexina V $^{+}$ \pm SEM = $0,89 \pm 0,058$ en $n = 15$ individuos con LES frente a $1,1 \pm 0,043$ en $n = 12$ donantes sanos con una $p = 0,01$; **Fig.17B**) confirmando así lo descrito por otros autores (Kovacs et al., 1996).

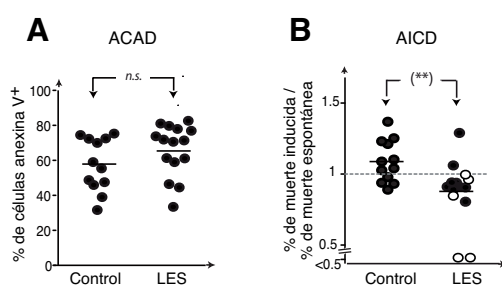


Figura 17. El mecanismo de AICD se ve afectado en células T de individuos con LES.

(A) El diagrama de puntos muestra el porcentaje de células anexina V $^{+}$ en células T sometidas a un protocolo de apoptosis espontánea (Kovacs et al., 1996) en muestras de individuos control ($n = 12$) y de pacientes de LES ($n = 15$). (B) El diagrama de puntos donde se representan los valores de AICD (apoptosis específica/apoptosis espontánea) de 12 individuos control y 15 individuos con LES. Los círculos con sin relleno son los correspondientes a los individuos con LES en estadio activo mientras que los rellenos son individuos con LES en estadio inactivo. Para el análisis estadístico (GraphPad Prism V5.0) se aplicó un test de Student aplicando la corrección de Welch en el caso de AICD, entre ambos grupos. (**) $P < 0,01$, n.s. = no significativo.

VI. Determinación de posibles relaciones de la actividad PI3K y la resistencia al mecanismo de AICD en las células T de pacientes con LES.

La alteración en el mecanismo de AICD puede dar lugar a la acumulación de células T con fenotipo memoria/efector autorreactivas (**Fig.18**; Krammer et al., 2007; Zhang et al., 2001).

La activación de PI3K es suficiente para la supervivencia de las células T (Borlado et al., 2000a), el defecto en AICD en las células T de los individuos con LES podría deberse a la actividad de PI3K, en concreto a la actividad de p110δ la cual está elevada en las células T de estos pacientes.

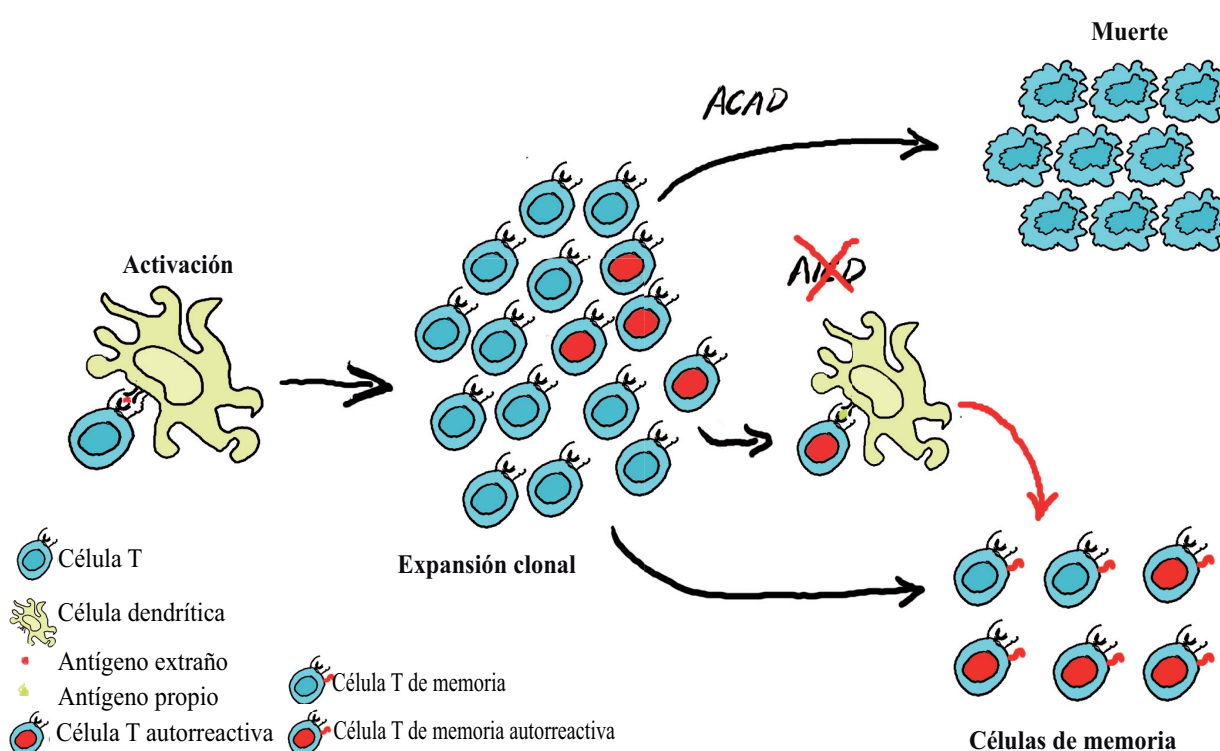


Figura 18. La alteración del mecanismo de AICD puede dar lugar a la acumulación de células T de memoria.

Este mecanismo da lugar a la muerte de las células activadas que responden a antígenos propios de manera específica en ausencia de un ambiente coestimulador apropiado (Krammer et al., 2007). Defectos en este mecanismo podrían dar lugar a la acumulación de células T de memoria autorreactivas como se demuestra en diversos modelos de ratón (Borlado et al., 2000b; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001).

VI.I- La actividad de PI3K tiene relación con la apoptosis en células Jurkat.

Para testar si la alteración en la actividad de PI3K da lugar a la resistencia a AICD se expresaron mutantes de p110δ o p110γ catalíticamente inactivos en células Jurkat (Alcázar et al., 2007; Okkenhaug et al., 2002). Estas células son una línea celular de leucemia T humana que no expresan PTEN, razón por la que presentan activación de la ruta PI3K/PKB (Shan et al., 2000). Estas células fueron electroporadas con el vector vacío como control, con el KR p110δ o con el KR p110γ dejando entre 24 o 48h para que se expresara, o bien con una isoforma constitutivamente activa denominada p110δ-CAAX (esta

isoforma lleva añadido en la zona C terminal un dominio CAAX el cual es farnesilado en el aparato de Golgi yendo y anclándose a la membrana celular donde p110 δ tiene su sustrato y sobre el que puede actuar de manera continua). La expresión de la isoforma constitutivamente activa da lugar al incremento moderado de la señal de pPKB y a la reducción, también moderada de AICD (**Fig.19A**). Las isoformas KR tanto de p110 δ como de p110 γ provocaron la reducción de la señal de pPKB e incrementaron la AICD en las células Jurkat (**Fig.19B y C**). Estos resultados fueron confirmados usando inhibidores específicos de las isoformas de PI3K, AS252424 para p110 γ , IC87144 para p110 δ y Ly294002 como un inhibidor de PI3K no específico de isoforma (Pomel et al., 2006; Shadu et al., 2003). La inhibición de p110 δ y p110 γ redujeron los niveles de pPKB e incrementaron la AICD en las células Jurkat, aunque en el caso de la inhibición de p110 γ no es estadísticamente significativa (**Fig.19B y C**), confirmando que la vía de PI3K/PKB juega un papel en la modulación de la AICD.

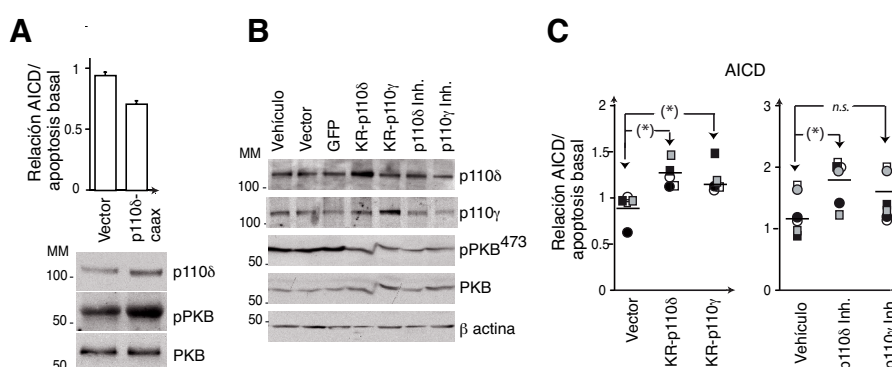


Figura 19. La actividad PI3K se relaciona con el mecanismo de AICD en células Jurkat.

(A) Inmunoblot representativo del incremento del valor de p110 δ y pPKB⁴⁷³ en células Jurkat transfectadas con p110 δ -CAAX y el comportamiento de estas células frente a la inducción de AICD (n = 3). (B) Inmunoblots de los niveles de expresión de células Jurkat transfectadas con vector, vector-GFP, o las construcciones de KR-p110 δ y KR-p110 γ o los inhibidores de p110 δ (IC87144), p110 γ (AS252424) o DMSO como vehículo control. (C) Diagrama de puntos donde se muestran los valores de las células Jurkat transfectadas con las construcciones antes indicadas o con los inhibidores específicas de isoforma (cada símbolo representa un experimento). El tratamiento estadístico se realizó como en el caso de la Fig. 17.

La especificidad de estos inhibidores se testó mediante el uso de células NIH-3T3, una línea celular de fibroblastos de ratón, transfectadas con una de las distinta isoformas catalíticamente activas de PI3K (p110 α -, p110 β - p110 δ - o p110 γ -CAAX) o con el vector vacío como control. En la **Fig.20** se muestra que los inhibidores de p110 δ y p110 γ son específicos a las concentraciones utilizadas.

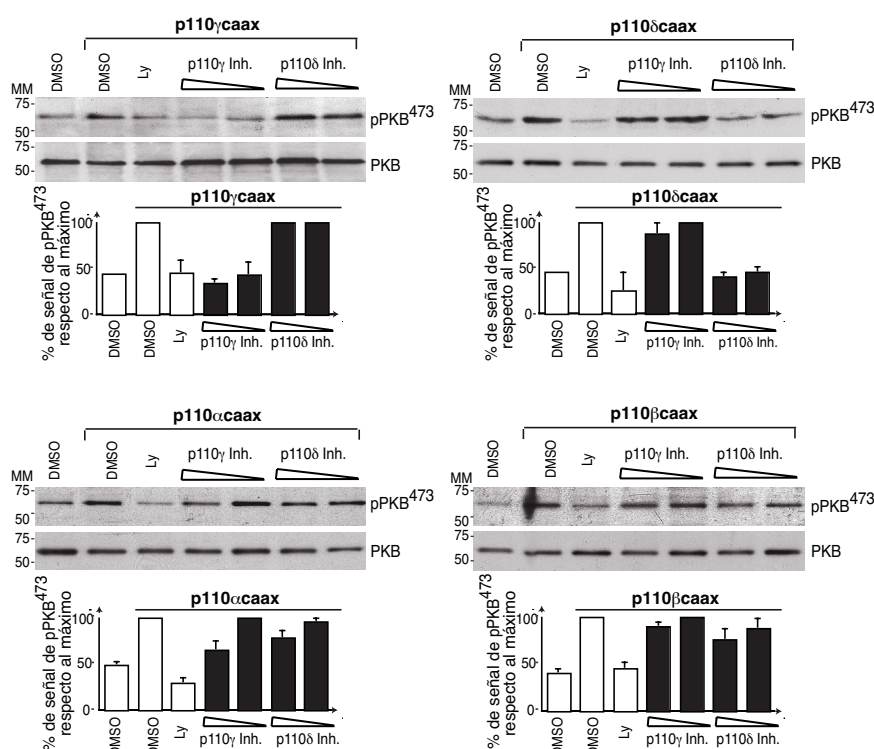


Figura 20. Los inhibidores IC87144 y AS252424 son específicos para p110δ y p110γ, respectivamente, a las concentraciones utilizadas.

Inmunoblots y cuantificación representativos de los ensayos de especificidad de los inhibidores IC87114 y AS252424. Células NIH-3T3 fueron transfectadas con construcciones de p110α, p110β, p110γ, o p110δ. A las 24 horas tras la transfección se lavaron e incubaron otras 12 horas con medio sin suero al que se añadió DMSO, Ly294002, IC87114 o AS252424 a las concentraciones de 10μM para Ly294002, 10μM y 1μM para IC87114 y de 5μM y 1μM para AS252424. Los gráficos de barra muestran la media ± SEM de los valores de pPKB⁴⁷³ normalizados respecto a PKB y frente al máximo de cada experimento (n = 3).

VI.II.- La inhibición de p110δ recupera el defecto en AICD de las células T de individuos con LES.

Junto a la demostración en células Jurkat, varios estudios demuestran la importancia de la familia de las PI3Ks en el mecanismo de AICD (Billottet et al., 2006; Xu et al., 2008; Billottet et al., 2009). Por esta razón, se realizaron ensayos de AICD con el uso de inhibidores específicos de la isoforma p110δ y de p110γ. La isoforma p110γ no fue descartada, a pesar de no haber visto diferencias entre la actividad en PBMCs de pacientes con LES y control, debido a los estudios en ratón en los que la inhibición o eliminación de esta isoforma da lugar a la cura de la enfermedad o impide su desarrollo (Barber et al., 2005a; Barber et al., 2005b). Además también se utilizó el inhibidor general de PI3K, LY-294002.

La inhibición *in vitro* de la isoforma p110δ (IC87114), pero no de p110γ (AS252424), en las células T de individuos con LES durante la re-estimulación con anti-CD3ε en el protocolo de AICD da lugar a la sensibilización de estas células a este mecanismo, sin alterar el comportamiento de las células T de los donantes sanos (Fig.21A). Esta muerte llega hasta niveles de los individuos control sanos, lo que parece indicar una reversión del defecto en este mecanismo (Fig.21B).

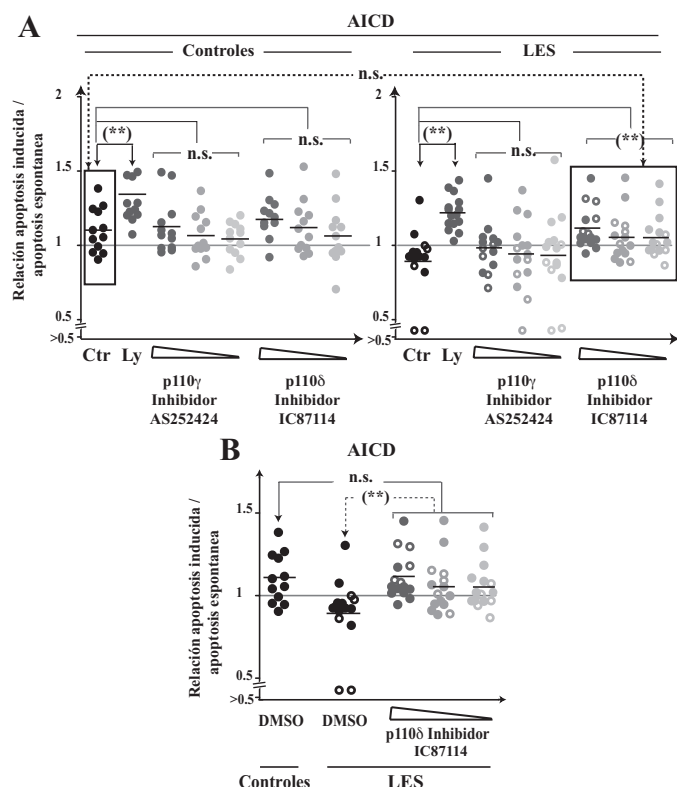


Figura 21. La inhibición de p110 δ , pero no la de p110 γ , recupera el mecanismo de AICD en células T de pacientes con LES.

(A) Los gráficos de puntos representan los valores de AICD de las células T tanto de controles ($n = 12$) como de pacientes ($n = 15$), mismos valores que en la Fig.18B, comparado con los valores de las “mismas” células tratadas con el inhibidor de p110 γ AS252424 (a concentraciones de 5, 1 y 0,5 μ M), el de p110 δ IC87114 (a concentraciones de 10, 1 y 0,5), Ly294002 como inhibidor general de las PI3K (a una concentración de 10 μ M) o DMSO como control del vehículo de las drogas. Los valores, al igual que en la Fig.18B, son el resultado de (apoptosis específica/apoptosis espontánea). En los pacientes con LES los círculos blancos corresponden a los pacientes en fase activa y los negros a aquellos en fase inactiva. Para el tratamiento estadístico se aplicó un test de ANOVA de una cola con el software GraphPad Prism V5.0 (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$. *n.s.*, no significativo.

De manera adicional se comprobó si las concentraciones utilizadas para los ensayos, serían capaces de interferir en la activación de células T sanas. Para testar esto utilizamos PBMCs de donantes sanos y de LES que se estimularon mediante CD3 y CD28. Se analizó la proliferación de estas células mediante incorporación de timidina tritiada, en condiciones de presencia o no de los inhibidores a las distintas concentraciones. Las concentraciones más altas utilizadas de ambos inhibidores serían capaces de interferir la activación y proliferación de estas células, disminuyendo la proliferación hasta en un 50% con respecto al control, sin embargo en el caso de las otras concentraciones no se supera el 20% de la inhibición de la proliferación (Fig.22).

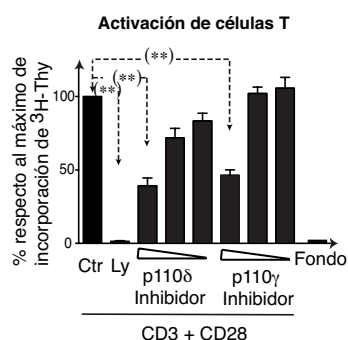
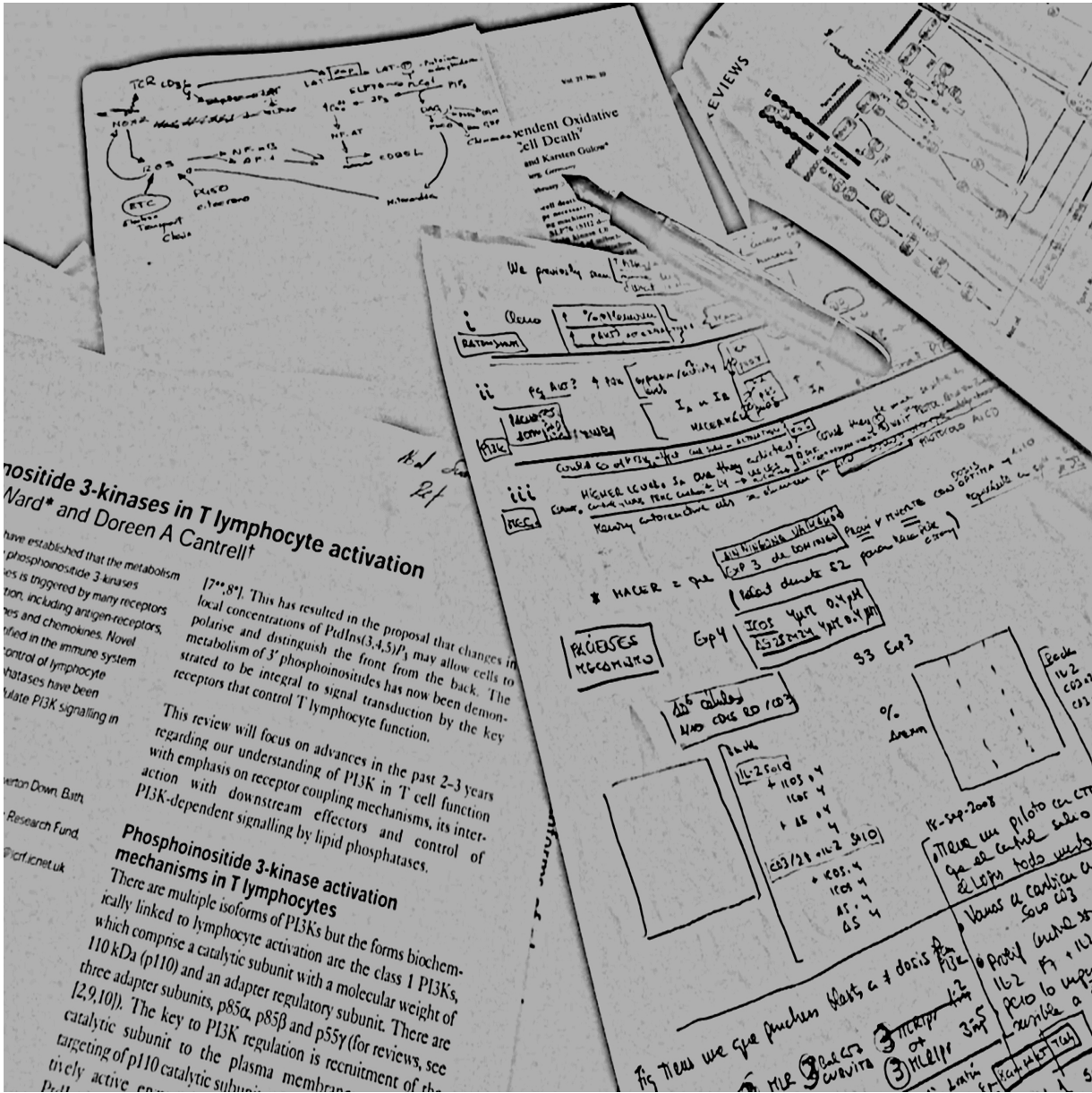


Figura 22. La inhibición de p110 δ permite la activación y proliferación de células T de individuos control sanos a las que afecta, pero no de manera drástica.

La gráfica de puntos muestra la media \pm SEM de los valores de proliferación a 72h de PBMCs de donantes sanos ($n = 6$) estimuladas con anti-CD3+ anti-CD28 unidos a placa, medida por los valores de incorporación de timidina tritiada las últimas 16 horas. Los valores fueron normalizados en cada experimento respecto al control de proliferación, las células estimuladas con anti-CD3 + anti-CD28 + DMSO, que fue considerado como el 100% de proliferación. Para el tratamiento estadístico se aplicó un test de ANOVA de una cola con el software GraphPad Prism V5.0 (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$. *n.s.*, no significativo.

Discusión



Discusión:

La principal función del sistema inmunológico es nuestra defensa frente a patógenos externos y alteraciones internas, tal y como se demuestra en los estudios de respuesta del sistema inmune frente a la formación de tumores. Sin embargo, defectos en la función de este sistema pueden dar lugar a una serie de patologías denominadas enfermedades autoinmunes. El origen de estas enfermedades es diverso, complejo e incluso en algunos casos aún hoy desconocido. Una de estas enfermedades es el Lupus Eritematoso Sistémico.

En las últimas décadas se ha descubierto el importante papel de las isoformas p110 δ y p110 γ en los leucocitos, situando a estas enzimas como posibles dianas terapéuticas en varias enfermedades autoinmunes o de origen inmunológico (Fruman y Bismuth, 2009).

La familia de las lípido-proteína quinasas PI3K de clase I, y diferentes componentes de las rutas que controlan a través de la generación del lípido de membrana PIP₃, están implicadas la mayoría de las distintas patologías englobadas dentro de la terminología *cáncer* debido a su papel en la supervivencia y control del ciclo celular (Liu et al., 2009).

Diversos modelos de ratón indican que la activación de la ruta de PI3K/PKB de manera constitutiva en sus linfocitos, además de generar tumores *no sólidos* provoca el desarrollo unas patologías similares al LES humano, cursando especialmente con alteraciones en la homeostasis de las células T (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001).

En la presente tesis doctoral se ha descrito y analizado el papel, o al menos una parte de este, que pueden tener las PI3K, en concreto las isoformas p110 δ o p110 γ , en la células T de pacientes con la enfermedad del LES. El trabajo desarrollado se ha dividido en tres partes, una primera en la que se ha realizado una descripción de la vía de PI3K en PBMCs y células T procedentes de la sangre periférica de pacientes con LES en comparación con individuos sanos. En la segunda parte del trabajo se ha determinado la relación entre el estado de activación de la vía PI3K y diferentes parámetros de la homeostasis de las células T de estos pacientes, tales como la relación de células memoria/naïve y algunos de los mecanismos de tolerancia periférica de estas células. Finalmente, en el tercer apartado se ha comprobado si la inhibición de las isoformas δ o γ de PI3K podría recuperar la alteración observada en el mecanismo de tolerancia periférica, AICD, en las células T de los individuos con LES.

Clasificación de los pacientes.

Antes del inicio del estudio se estableció una clasificación de los pacientes con LES en dos grupos, uno de individuos en estadio activo y otro en estadio inactivo. Esta división se realizó en base al SLEDAI de estos pacientes calculado por los médicos que han colaborado en el estudio. Se establecieron como individuos en estadio inactivo aquellos con un SLEDAI menor que 4 y en estadio

activo aquellos con 4 o más. Esta segmentación es arbitraria, al igual que en la mayoría de los estudios, tal y como se demuestra en la literatura científica donde los límites de separación entre estos dos grupos son variables. Incluso dentro del grupo de individuos activos algunos autores realizan varios subgrupos (Mader et al., 2007; Molad et al., 2010). Los límites escogidos para este trabajo se reflejan en diversas publicaciones (Katsiari et al., 2005; Le Buanec et al., 2011; Molad et al., 2010) y fue la aconsejada por nuestros colaboradores ya que era la que mejor reflejaba su valoración del paciente tanto en estadio activo (pacientes con nuevos brotes o rebotes de síntomas preexistentes) como en pacientes en estadio inactivo (aquellos en estado estable o con remisión de los síntomas de la enfermedad).

La vía de PI3K/PKB se encuentra activa en las PBMCs, y en concreto en los linfocitos T de individuos con LES, mostrando una mayor actividad de la subunidad p110δ.

La generación de PIP_3 por PI3K en la membrana celular da lugar al reclutamiento de proteínas que poseen un dominio PH. Dos de estas proteínas son PKB y PDK1, los efectores mas importantes de PI3K. La localización de estas proteínas en la membrana celular da lugar a la fosforilación en el residuo Thr³⁰⁸ de PKB por parte de PDK1 (Deane y Fruman, 2004). La fosforilación del residuo Ser⁴⁷³ es debida al complejo mTORC2-Rictor (Chua et al., 2009) y da lugar a la completa activación de PKB. A pesar de que hoy en día existe una discusión científica acerca de la relación entre ambas fosforilaciones y sus funciones (Hers et al., 2011), otros grupos (Kouroumalis et al., 2005; Otero et al., 2001; Shenoy et al., 2003) y nosotros (**Fig.5A**), hemos demostrado que en los linfocitos estas fosforilaciones van en paralelo, siendo válida cualquiera de las dos como indicador del estado de la vía de PI3K/PKB. En base a ésto, hemos escogido la fosforilación Ser⁴⁷³ porque el anticuerpo daba menos fondo y menos bandas no específicas. Como se muestra en la **Fig.5B, C, D y E** los niveles de fosforilación de la proteína PKB tanto en PBMCs como en células T de individuos con LES son más altos que los de las muestras de donantes sanos. Actualmente existen otras publicaciones que presentan datos similares a los nuestros e incluso que los complementan indicando, como es de esperar en base a los resultados ya mostrados, que tanto las PBMCs como las células T de los pacientes con LES presentan niveles más altos de fosforilación de las proteínas p27^{Kip1}, p21^{WAF1/CIP1}, GSK3 β en el residuo Ser⁹ (Tang et al., 2009) y además p70S6K en los residuos Thr⁴²¹ y Ser⁴²⁴ (Besliu et al., 2009), todas dependientes de la vía de las PI3K (Krasilnikov, 2000; Liang y Slingerland, 2003). En el caso de Besliu et al. (2009) realizan el estudio analizando la fosforilación de PKB en el residuo Thr³⁰⁸ obteniendo resultados similares a los nuestros y confirmando nuestras observaciones.

Se sabe que los individuos con LES presentan mayores porcentajes de células T con fenotipo de memoria /efector que los individuos control (Neidhart et al., 1996). Las células T de memoria presentan una mayor actividad de PI3K (Barber et al., 2005b). Por tanto decidimos comprobar si la mayor activación de la vía en pacientes era debida a una mayor proporción de estas células con fenotipo memoria/efector. Por microscopía confocal (**Fig.6**) se demostró que los niveles de pPKB⁴⁷³ son más altos (mayor intensidad bajo los mismos parámetros y condiciones de calibrado del aparato) y con una

localización en membrana, lo que demuestra su activación en linfocitos T CD4⁺ tanto con fenotipo efector/memoria (CD45RO⁺) como naïve (CD45RA⁺), indicando que la actividad elevada en estas células no es exclusivamente debido al mayor porcentaje de células T de memoria.

También se observó por microscopía confocal el mismo fenómeno en células B (CD19⁺) de sangre periférica de pacientes de LES, los cuales nuevamente presentan una tinción más intensa y con una mayor localización en membrana de pPKB que los individuos control (**Fig.7**).

El principal regulador negativo de PI3K es la fosfatasa PTEN. Se ha demostrado que la simple ausencia de uno de los alelos de esta proteína en modelos de ratón da lugar al desarrollo de una patología similar al LES humano (Di Cristofano et al., 1999), por ello analizamos los niveles de expresión de esta proteína en PBMCs de individuos con LES para ver si eran menores que los de los individuos control sanos. Esta podía ser la explicación de la activación de la vía PI3K/PKB en las PBMCs de estos pacientes, sin embargo como se muestra en la **Fig.8** no se observan estas diferencias, por lo que se descarta que el incremento de actividad de la vía de PI3K/PKB en PBMCs de los individuos con LES se deba a alteraciones en los niveles de este regulador negativo de la vía.

En el estudio se incluyeron 12 pacientes de otra enfermedad autoinmune sistémica, la artritis reumatoide, para comparar si la activación de PI3K en los linfocitos de sangre periférica era común a las enfermedades autoinmunes sistémicas o era una característica propia del LES. Como se muestra en la **Fig.9** no se observan diferencias entre los niveles de fosforilación de PKB entre los individuos control y los pacientes con AR. Esto también es confirmado por otros autores (Tang et al., 2009), e indica que la detección de la activación de la vía de PI3K en las células de sangre periférica no es común a todas las enfermedades autoinmunes sistémicas. Sin embargo, algunos estudios muestran la importancia de esta vía en distintos tipos de células en la zona sinovial de las articulaciones de estos pacientes (Liu y Pope, 2003).

En el modelo de ratón MRL/lpr se ha visto que la señal de PI3K/PKB observada en los esplenocitos es debida a la actividad de p110 γ . La inhibición de esta isoforma *in vivo* da lugar a la disminución de los niveles de fosforilación de la proteína PKB en estas células (Barber et al., 2005a; Baber et al., 2005b). Realizamos un análisis de la actividad PI3K en extractos obtenidos de PBMCs de pacientes con LES e individuos sanos utilizando anticuerpos específicos para la isoforma de p110 δ y p110 γ . Partíamos de la hipótesis, según lo observado en ratón, de que p110 γ sería la isoforma responsable de la actividad PI3K en las células de los individuos con LES. Sin embargo, tal y como se muestra en la **Fig.10C**, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la actividad de p110 γ referida a los niveles de proteína entre las muestras de individuos con LES y las de los individuos control. En cambio, la media de la actividad específica de p110 δ referida a los niveles de proteína de cada individuo es mayor en las muestras obtenidas de los pacientes que en las de los donantes sanos (**Fig.10C**).

En pequeño grupo de pacientes se determinó la actividad PI3K asociada a Zap70 la cual, como hemos demostrado en esta tesis, será principalmente debida a p110 δ (**Fig.11A**). Zap70 es expresada

principalmente en células T (Chan et al., 1994), con lo que la actividad PI3K quinasa asociada la hemos interpretado como una medida indirecta de la actividad de p110δ en células T. Como se muestra en la **Fig.8B**, la actividad de p110δ en células T de individuos con LES es mayor que en células T de los individuos control. Esto implica que la activación de la vía PI3K/PKB en PBMCs y células T de individuos con LES es debida, al menos en parte, a la actividad de p110δ.

La vía de PI3K/PKB está relacionada con la subpoblación de células de T de memoria en pacientes con LES.

Una de las alteraciones que tienen en común los modelos de ratón de LES es el incremento en el número de las células CD4 junto con una disregulación de la relación células de memoria y células naïve ($CD4^+CD44^{high}CD62L^{low}$ y $CD4^+CD44^{high}CD62L^{low}$) (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001).

En nuestro estudio evaluamos las poblaciones de PBMCs en nuestra población de pacientes para compararlo con los niveles de activación de la ruta en controles y pacientes. El análisis por citometría de flujo de las poblaciones de las PBMCs mostró un ligero incremento de la población de células B ($CD19^+$) y una disminución de células T ($CD3^+$), aunque sin significancia estadística (**Fig.12**). Otros autores han realizado estas observaciones en un estudio con mayor número de individuos (Messner et al., 1973) indicando además la existencia de significancia estadística en las diferencias. El incremento de las células B de los individuos con LES, en las cuales hemos visto que la vía de PI3K se encuentra activa (**Fig.11**), iría en concordancia con lo observado en los modelos de ratón que presentan activación de esta vía (Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001). Por otro lado comprobamos que la reducción de células T era debida a la reducción de células T $CD4^+$ (**Fig.12**), lo que contrasta con los datos de ratón. Sin embargo se sabe que en el suero de pacientes con LES hay anticuerpos anti-CD4 que no se han descrito en ratón y que provocaría la eliminación de estas células (Tanaka et al., 1989). Además se ha descrito una mayor expresión de la molécula Fas en linfocitos de pacientes con LES, especialmente en células CD4 naïve ($CD4^+CD45RO^-CD45RA^+$), que correlaciona con la linfopenia de estas células (Amasaki et al., 1995). Otros autores han descrito que las células T de los individuos con LES presentan mayor susceptibilidad a sufrir apoptosis espontánea debido a alteraciones en el potencial de las mitocondrias y defectos metabólicos (Perl et al., 2004).

Cuando examinamos el fenotipo de estas células observamos, tanto en células T $CD4^+$ como en las células $CD8^+$ una alteración de la proporción de células de memoria y naïve ($CD45RO^+/CD45RA^+$; **Fig.14**) observándose un incremento del porcentaje de las células T de memoria ($CD45RO^+$; **Fig.13A y B**). Esta observación también ha sido descrita previamente por otros autores (Neidhart et al., 1996). En paralelo hemos analizado la expresión de CD29 comprobando que correlaciona con la de CD45RO en las células T de nuestra población de pacientes (**Fig.13B**), confirmando el fenotipo memoria/efector de éstas células (Shimizu et al., 1990; Tanigawa et al., 1998).

En un subgrupo de pacientes estudiamos la correlación entre los niveles de pPKB y las distintas subpoblaciones de células T. De esta manera hemos encontrado que existe una correlación positiva entre el número de células CD4 con fenotipo de memoria y los niveles de pPKB⁴⁷³ en individuos en fase activa, pero no en el resto de individuos ni en el resto de subpoblaciones celulares (**Fig.15A y B**). En estos pacientes en fase activa encontramos además una correlación entre los niveles de pPKB y la relación de células de memoria y células naïve (**Fig.15C**). Todos estos resultados pueden indicar que la activación de esta vía puede favorecer o bien la supervivencia o bien la diferenciación de las células T con fenotipo de memoria, tal y como se observa en los modelos de ratón que presentan activación de esta vía en las células T (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Rathmell et al., 2003; Suzuki et al., 2001). El hecho de que se encuentre esta correlación solo en individuos activos puede ser debido a que estos individuos se encuentran generando una respuesta inmunológica en la que se induce, entre otras, la vía de PI3K, como se ha visto en la introducción y que estaría de acuerdo con modelos de ratón como los MRL/MpJ o los MRL/lpr en los que la enfermedad estaría continuamente en una *fase activa* y en los que se detecta un incremento de activación de la vía de PI3K/PKB (Barber et al., 2005b).

La activación de la vía de PI3K (p110δ) explica la resistencia de las células T de los pacientes con LES al mecanismo de tolerancia periférica de AICD.

Se han descrito diferentes mecanismos de tolerancia periférica alterados en las células T de pacientes con LES. Uno de estos mecanismos sería la función de las células T reguladoras. En la bibliografía existe actualmente una discusión sobre si el número de estas células es normal o no con el consenso de que al menos su función no lo es (Alvarado-Sanchez et al., 2006; Miyara et al., 2005; Valencia et al., 2007). Debido al pequeño volumen de muestra con el que contábamos y las diferentes pruebas que se han llevado a cabo en este estudio, se decidió dejar de lado este mecanismo. La isoforma p110δ es esencial en la generación de las células Treg en el timo aunque en este punto no entraremos ya que sería solo aplicable a la enfermedad en determinados modelos de ratón. Sin embargo, se sabe que la activación constitutiva de PKB impide o dificulta la generación de células Treg periféricas (Haxhinasto et al., 2008) así como su capacidad de suprimir la activación y proliferación de las células T. Sin embargo, la función de las células T reguladoras y la implicación de PI3K en estas células en pacientes con LES necesita ser estudiada en mayor profundidad.

Otro de los mecanismos de tolerancia periférica de las células T es la anergia. La integridad de este mecanismo en pacientes con LES se discute en la literatura, encontrando autores que indican que no se encuentra afectado o que los pacientes con LES podrían incluso presentar mayor número de células T en estado anérgico que los donantes sanos (Paty et al., 1975; Tsokos y Liossis, 1999). Otros autores sugieren que las células T de pacientes con LES resisten la inducción de anergia por la sobre-expresión de Cox2 y un defecto en la fosforilación de Cbl-b, siendo capaces de expresar CD40L, molécula importante en la interacción de células T y B para la producción de anticuerpos anti-ADN (Xu et al., 2004; Yi et al., 2000). Dado que PI3K está implicada en la proliferación de las células T,

nuestra hipótesis fue que si la vía de PI3K estaba activada, o era más fácilmente activada, en las células T de individuos con LES quizás fuera posible que estas células presentaran un defecto en anergia y proliferaran en condiciones de activación sin moléculas coestimuladoras (protocolo clásico de inducción de anergia *in vitro*; Wolf et al., 1994). Como se observa en la **Fig.16** las células T de individuos con LES entran en un estado de anergia igual que las células T de individuos sanos ya que no son capaces de proliferar tras la inducción de este mecanismo.

Los últimos dos mecanismos estudiados fueron los de apoptosis en células T, tanto la espontánea o ACAD como la inducida por activación o AICD, dado que la vía de PI3K/PKB también está implicada en la supervivencia de las células T y la resistencia a estos mecanismos (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Suzuki et al., 2001). Varios autores muestran que la apoptosis espontánea es mayor en células T de individuos con LES que en las de individuos sanos (Kovacs et al., 1996; Perl et al., 2004). Nosotros observamos un ligero incremento en este mecanismo, no estadísticamente significativo (**Fig.17A**). Esto significaría que *in vitro* y bajo el protocolo que hemos seguido (Kovacs et al., 1996) o bien no se mantiene la activación de la vía de PI3K/PKB observado *ex vivo*, o que esta vía no supone una ventaja en la supervivencia de estas células.

En referencia al mecanismo de AICD, varios autores describen que las células T de los pacientes con LES presentan una mayor resistencia que las de los donantes sanos (Kovacs et al., 1996; Xu et al., 2004) a pesar de que se observa una mayor expresión de la molécula FasL (Kovacs et al., 1997). Bajo las condiciones utilizadas *in vitro*, nosotros también observamos una mayor resistencia a este mecanismo por parte de las células T de pacientes de LES (**Fig.17B y 21**). Estos datos concuerdan con lo observado en los modelos de ratón que presentan la vía PI3K activada (Borlado et al., 2000; Di Cristofano et al., 1999; Parsons et al., 2001; Suzuki et al., 2001). La alteración de este mecanismo podría dar lugar a la acumulación de células T de memoria antígeno específicas que mantengan la enfermedad y den lugar a rebrotes.

De acuerdo con nuestros resultados, esta resistencia es debida a la activación de p110δ ya que su inhibición da lugar a la recuperación de la muerte de estas células que alcanzan un comportamiento similar a las de los individuos sanos (**Fig.21A y B**). Recientemente se ha descrito que la apigenina, un flavonoides que inhibe la vía de PI3K/PKB sensibiliza a las células T a la apoptosis inducida por activación debido a que impide la activación del factor de transcripción NF-κB que regula moléculas antiapoptóticas como cFLIP, Bcl-XL, Mcl-1, etc. (Xu et al., 2008), cuya expresión se incrementa en las células T de individuos con LES en condiciones de AICD (Xu et al., 2004). Con la inhibición de p110δ mediante un inhibidor específico, nosotros observamos dicha sensibilización de manera específica en las células T de los pacientes con LES pero no en las células T de los donantes sanos sometidas al mismo tratamiento. Las células T de individuos con LES muestran la expresión de FcεRIγ y Syk y represión de CD3ζ aunque sin alteraciones en los niveles de Zap70 (Krishnan et al., 2008). Se sabe que Zap70, pero no Syk, media AICD en células T (Sahuquillo et al., 1998; Zhong et al., 2004). De este modo Zap70 podría activar la maquinaria implicada en el mecanismo de AICD tras la estimulación

del TCR en las células T con fenotipo de memoria/efector de individuos con LES. Sin embargo la hipotética activación de p110 δ a través de Fc ϵ RI γ -Syk podría bloquear este efecto debido a la activación de señales de supervivencia (expresión de Bcl-x_L, Mcl-1, Cox-2, etc.) tal y como se observa en el trabajo de Luting et al. (2004). Además se ha descrito que la quinasa Lck, necesaria para el mecanismo de AICD (Yu et al., 2004) e involucrada en la activación de PI3K, presenta niveles de expresión bajos en las células T de individuos con LES debido a un proceso de ubiquitinización y degradación (Jury et al., 2003). Este mecanismo también podría contribuir a la resistencia de las células T de pacientes con LES a la muerte inducida por activación (AICD). El inhibidor Ly-294002 da lugar a un incremento de muerte generalizado tanto en las células T de los individuos con LES como en los controles sanos, probablemente debido a que la inhibición generalizada de todas las isoformas de PI3K reduce la vía de supervivencia (**Fig.22**).

De manera adicional realizamos con células T de donantes sanos unos ensayos de proliferación con estimulación por CD3 y CD28 en presencia o no del inhibidor de p110 δ . Este ensayo se realizó para comprobar si las concentraciones del inhibidor de p110 δ que restauran el comportamiento *normal* de las células T *patógenas* de pacientes con LES frente al estímulo de AICD alteraban o no la activación de las células T *normales* ante un estímulo completo de activación. Nuestros resultados muestran que solo la dosis más alta, 10mM causaría una inhibición grave de la activación de las células T, mientras que las dosis intermedia y baja, afectan pero de una manera no significativa a la proliferación de estas células T *sanas*. Resultados similares fueron observados por (Soond et al., 2010)

Posibles mecanismos de activación de PI3K δ en células T de la sangre periférica y PBMCs en pacientes con LES.

Como hemos argumentado, la activación de p110 δ da lugar a la resistencia al mecanismo de AICD de las células T de individuos con LES al menos *in vitro*. Además se ha visto que la actividad *ex vivo* de p110 δ esta elevada tanto en PBMCs como en células T de estos pacientes. Sin embargo no se sabe por qué este encima esta activado.

No se han descrito alteraciones genéticas en relación con *PIK3CD* ni en genes relacionados en pacientes con LES, aunque quizás debería de abordarse un estudio específico. Existen alteraciones tanto en las células T como en el ambiente que interacciona con estas células (factores del suero) de individuos con LES que pueden explicar el incremento de activación de la proteína p110 δ en estos pacientes. Se ha descrito que en el suero de pacientes con LES existen factores capaces de activar la ruta de PI3K/PKB en linfocitos T, tanto de pacientes con LES como de donantes sanos (Liang et al., 2008). Li et al. (2007) describe la presencia de anticuerpos anti-CD3 ϵ en suero de pacientes con LES. Se sabe que estos anticuerpos estimulan el TCR induciendo la activación de diferentes vías como son las de Rock, PKC y probablemente PI3K. Además Liossis et al. (1998) describe que en las células de estos pacientes existe una reducción de la expresión de la cadena CD3 ζ del complejo CD3, tanto a nivel de proteína como de mRNA. Esta es una cadena crítica en la señalización del TCR ya que contiene tres motivos

de fosforilación (ITAMs) que van a reclutar a otras proteínas como son Zap70 y Lck, necesarias para la señalización que lleva a la producción de IL-2, la cual a su vez es necesaria para la sensibilización de las células T al mecanismo de AICD. En las células de pacientes de LES CD3 ζ es reemplazado por la cadena Fc ϵ RI γ , la cual no suele ser expresada en células T de individuos sanos (Krishnan et al., 2008). Esta cadena es capaz de asociarse con CD3 ϵ como CD3 ζ , pero en lugar de unir Zap70 une otra molécula de la misma familia, Syk, la cual se expresa en células T de LES pero no (o en muy bajos niveles) en las de individuos sanos (Nambiar et al., 2003). Syk une p110 δ (Schymeinsky et al., 2007) y el complejo Fc ϵ RI γ -Syk señala de una manera 100 veces más eficaz que el complejo CD3 ζ -Zap70 (Oliver et al., 1994). Esto podría explicar además el bajo umbral de activación de las células T de individuos con LES y su elevada señalización bajo el TCR (manifestada mediante un elevado flujo de calcio y la elevada fosforilación en residuos de tirosina de distintas proteínas del citosol; Vassilopoulos et al., 1995; Tenbrock et al., 2007)

En referencia a las células B se ha descrito en pacientes de LES la existencia de un polimorfismo de Ltk activador de PI3K (Li et al., 2004). Otro polimorfismo descrito en células B de pacientes con LES esta asociado a la molécula Fc γ RIIB, molécula que inhibe la señalización a través del BCR pero cuyo polimorfismo se ha demostrado que es menos potente en la inhibición de la activación de PI3K, PKB, etc., lo cual también podría explicar los mayores niveles de pPKB en células B de los pacientes. En el suero de pacientes con LES se han detectado elevados niveles de BAFF (del inglés *B cell activation factor*; Landolt-Marticorena et al., 2011) y de APRIL (del inglés *A proliferation-inducing ligand*; Koyama et al., 2012) moléculas que activa la ruta de p110 δ en células B a través de sus receptores (Gupta et al., 2009; Henley et al., 2008).

Posibilidades terapéuticas de la inhibición de p110 δ en la enfermedad del LES.

El tratamiento actual del LES está basado en la administración de inmunosupresores (glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos u otros) y antimaláricos que persiguen la inhibición de la respuesta inmunológica. A pesar de la mejora en la esperanza de vida que ha supuesto el uso de estos tratamientos en los pacientes con LES, su uso conlleva una serie de efectos secundarios negativos en ocasiones importantes y que imposibilitan una vida normal para el paciente (Sibilia, 2006). Por ello se sigue investigando en nuevas terapias. Algunas de las más recientes utilizan anticuerpos anti células B, en concreto actualmente existen en clínica dos: Rituximab (anti-CD20) y Epratuzumab (anti-CD22). A pesar de que estos fármacos, especialmente Rituximab, presentan buenos resultados en el tratamiento de pacientes (con remisiones de hasta 14 meses) presentan el inconveniente de la eliminación de la mayor parte de las células B, pudiendo comprometer al sistema inmunológico del individuo. Actualmente siguen realizándose estudios respecto a estos tratamientos ya que se han observado ciertos comportamientos aún no explicados (como la no bajada de los títulos de ciertos anticuerpos pero si de otros, etc.) y la resistencia a ellos en determinados pacientes. Se trabaja también en el uso de sustancias que hagan tolerantes a las células B frente a antígenos propios o en la inhibición de la señalización coestimuladora célula T célula B mediante el bloqueo de moléculas como CD40L, CD28 o CTLA4

con resultados aún adversos en pacientes aunque prometedores en ratones (Anolik et al., 2005). Otras terapias como el bloqueo de citoquinas tales como BLyS o BAFF, IL-10, TNF, IL-1, IL-18, IL-6, IL-15 o IFN α están aun en fases muy tempranas o no dan los resultados esperados cuando estos no son negativos (Anolik et al., 2005).

En este trabajo se ha demostrado que la inhibición de p110 δ en células T con fenotipo efector/memoria *in vitro* puede restaurar la sensibilidad de estas células al mecanismo de AICD. Las células de memoria son las células que mantienen la enfermedad, ya que son células T de larga duración capaces de responder frente a los antígenos que las activan (en este caso antígenos propios) con un umbral de activación más bajo que las células naïve. Estas células dan lugar a una respuesta inmune contra ese antígeno, colaborando en la activación de las células B para la producción de auto-anticuerpos. El tratamiento de los pacientes con p110 δ podría dar lugar a la eliminación de estas células y a dejar el paciente en un estado “reset” o 0, es decir, este tratamiento obviamente no sería capaz de solventar los defectos genéticos que son responsables en parte de la enfermedad, pero la eliminación de la células T de memoria podría dar lugar a que se tengan que dar nuevamente la combinación de los factores responsables del inicio de la enfermedad.

Esta hipótesis estaría respaldada en parte por el trabajo de Haylock-Jacobs et al. (2011). En este estudio demuestran que en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental en ratón, la supresión de la actividad de p110 δ da lugar a la eliminación por apoptosis de las células T que responden frente al antígeno que provoca la enfermedad (el péptido MOG, del inglés *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*). Además, demuestran que la inhibición de p110 δ afecta a la diferenciación y a la actividad de las células Th17, un subgrupo de células T que secretan la citoquina IL-17 y que conducen en parte la enfermedad en este modelo de ratón.

En células T humanas también se ha visto que la inhibición *in vitro* de p110 δ bloquea la producción de las citoquinas IL-17 (Haylock-Jacobs et al., 2011; Park et al., 2010), y la IL-10 (Patton et al., 2006), citoquinas íntimamente relacionadas con la patogénesis de LES (Crispin et al., 2008; Cui et al., 2011), debido a la afección de la propia síntesis, liberación y a la diferenciación de las células que las producen, Th1 y Treg respectivamente. La afección sobre las células Treg podría ser un aspecto negativo a tener en cuenta, sin embargo en la peor de las situaciones, en la inactivación completa de la proteína, solo se ha visto el desarrollo de una colitis subclínica debida a un defecto en los macrófagos, tal y como se ha visto en un modelo de ratón (Uno et al., 2010). También en ratón se ha visto que p110 δ controla la expresión de CD40L en células T, proteína implicada en la producción de autoanticuerpos por las células B (Rolf et al., 2010).

Actualmente se están realizando estudios clínicos de fase I con inhibidores de p110 δ en tumores como leucemia linfocítica crónica, linfomas Hodgkinís y no Hodgkinís, etc. con resultados prometedores y un nivel de seguridad aceptable (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?intr=%22CAL-101%22>).

En resumen, la inhibición de p110 δ probablemente podría corregir diferentes alteraciones

observadas en las células del sistema inmunológico de los pacientes con LES, algunas de las cuales se están intentando abordar como dianas terapéuticas de manera individual (Anolik et al., 2005), que conducen y mantienen la enfermedad. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios sobre el efecto de la inhibición de p110δ en otras células del sistema inmunológico de pacientes con LES, tales como células B y macrófagos, ya que en estas células, tal y como se ha explicado anteriormente, la actividad p110δ presenta una importante función.

¿ Tiene p110γ importancia terapéutica en la enfermedad de LES en humanos?

A pesar de que p110γ no muestra una mayor actividad en las PBMCs de individuos con LES comparados con los individuos control bajo nuestras condiciones de estudio, y que su inhibición no afecta a la respuesta de las células T de estos pacientes bajo condiciones de AICD, no puede ser descartada como una posible diana terapéutica. Los resultados de diferentes estudios *in vitro* y los obtenidos en los modelos de ratón informan sobre la función de esta isoforma en la activación y supervivencia de las células T y en la producción de citoquinas así como de su participación en distintas funciones de otras células del sistema inmune, especialmente en migración (Sasaki et al., 2000; Walker et al., 2006; Alcázar et al., 2007; Thomas et al., 2008; Randis et al., 2008; Hayer et al., 2009). En los modelos de ratón los estudios se realizan a partir de células obtenidas de bazo y/o nódulos linfáticos mientras que en humanos se realizan a partir de células obtenidas de sangre periférica (Barber et al., 2005a; Baber et al., 2005b). Probablemente estas células presenten comportamientos distintos debido a la diferencia en el *ambiente* que las rodea y las interacciones celulares que sufren. Esto hace necesario realizar más estudios acerca de la función de p110γ en la enfermedad humana de LES analizando otros mecanismos, como el de migración o activación, y probablemente partiendo de células obtenidas de otras muestras como por ejemplo, biopsias de nódulos linfáticos.

A modo de resumen final, en base a los resultados podemos concluir que la actividad de p110δ da lugar a la evasión del mecanismo de tolerancia periférica AICD por parte de las células T de individuos con Lupus Eritematoso Sistémico. La alteración de este mecanismo da lugar a la acumulación de células T con fenotipo memoria/efector, lo cual coincide con lo observado en los pacientes con LES en los que vemos mayor porcentaje de estas células. Dado que la inhibición de p110δ restaura o recupera el correcto funcionamiento de las células T de estos pacientes sometidos a la inducción de AICD *in vitro*, p110δ se postula como una molécula a tener en cuenta de cara al desarrollo de nuevos tratamientos para la enfermedad del LES. Nuevos estudios serán necesarios para la evaluación del potencial terapéutico de p110γ en la enfermedad humana del LES.



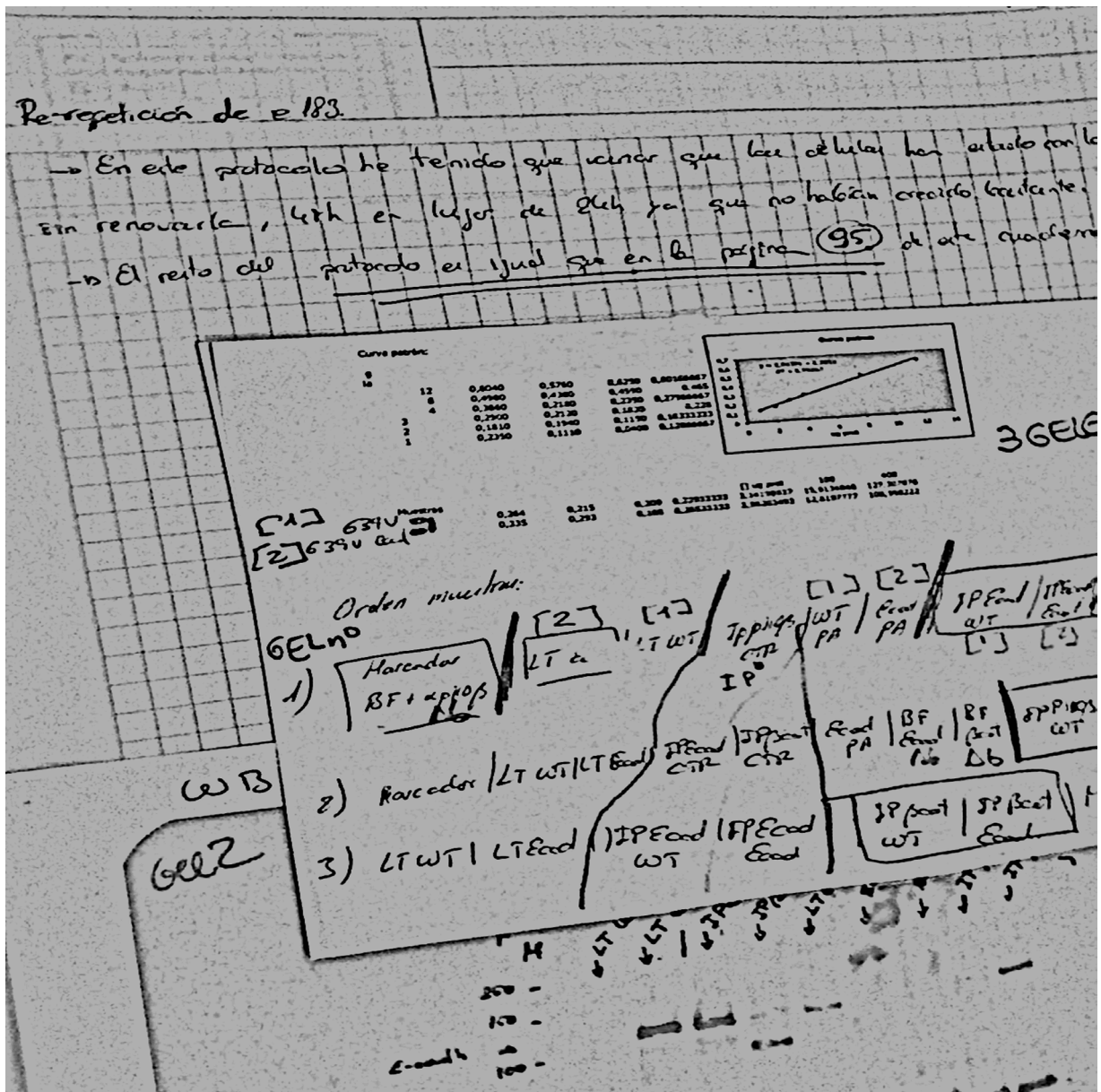
Conclusiones



Conclusiones:

- I. Las PBMCs, y en concreto las células T, de individuos con LES presentan mayores niveles de activación de la ruta de PI3K/PKB que las de los individuos control o que las de pacientes con otra enfermedad autoinmune sistémica como la Artritis Reumatoide.
- II. La activación de esta vía tiene lugar tanto en células T con fenotipo naïve como en aquellas con fenotipo de memoria, y también en células B, de individuos en estadio activo.
- III. La activación de la vía se debe a la actividad de p110 δ y no a alteraciones en los niveles de PTEN ni a la actividad de p110 γ .
- IV. Los individuos con LES presentan mayores porcentajes de células T con fenotipo de memoria que los individuos control sanos.
- V. Los niveles de activación de la vía PI3K/PKB correlacionan con el incremento de la relación entre las células T CD4 con fenotipo de memoria y las células T CD4 naïve en individuos LES en fase activa.
- VI. Las células T de los pacientes con LES presentan resistencia frente al mecanismo de tolerancia periférica de AICD.
- VII. El aumento de actividad de p110 δ confiere la resistencia a AICD en las células T de pacientes con LES.
- VIII. La inhibición de p110 δ con un inhibidor específico a bajas concentraciones, restaura la muerte inducida por activación en células T de pacientes con LES, sin afectar de una manera importante a la activación de células T sanas.

Referencias



Referencias:

- Acosta, Y.Y., M.P. Zafra, G. Ojeda, I.S. Bernardone, U. Dianzani, P. Portoles, and J.M. Rojo. 2011. Biased binding of class IA phosphatidyl inositol 3-kinase subunits to inducible costimulator (CD278). *Cell Mol Life Sci* 68:3065-3079.
- Alcazar, I., M. Marques, A. Kumar, E. Hirsch, M. Wymann, A. Carrera, and D. Barber. 2007. Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med* 204:2977-2987.
- Alderson, M.R. 1994. Regulation of immune responses by the ligands for CD27, CD30, and 4-1BB. *Circ Shock* 44:73-76.
- Alessi, D.R., S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, and P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7:261-269.
- Alvarado-Sanchez, B., B. Hernandez-Castro, D. Portales-Perez, L. Baranda, E. Layseca-Espinosa, C. Abud-Mendoza, A.C. Cubillas-Tejeda, and R. Gonzalez-Amaro. 2006. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 27:110-118.
- Amasaki, Y., S. Kobayashi, T. Takeda, N. Ogura, S. Jodo, T. Nakabayashi, A. Tsutsumi, A. Fujisaku, and T. Koike. 1995. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 99:245-250.
- Anolik, J.H. and M. Aringer. 2005. New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 19:859-78.
- Aujla, S.J., and J.F. Alcorn. 2011. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1810:1066-1079.
- Backer, J.M. 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410:1-17.
- Barber, D., A. Bartolome, C. Hernandez, J. Flores, C. Fernandez-Arias, L. Rodriguez-Borlado, E. Hirsch, M. Wymann, D. Balomenos, and A. Carrera. 2005a. Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol* 176:589-593.
- Barber, D.F., A. Bartolome, C. Hernandez, J.M. Flores, C. Redondo, C. Fernandez-Arias, M. Camps, T. Ruckle, M.K. Schwarz, S. Rodriguez, A.C. Martinez, D. Balomenos, C. Rommel and A.C. Carrera. 2005b. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nature medicine* 11:933-935.
- Bashyam, H.S., S. Green, and A.L. Rothman. 2006. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol* 176:2817-2824.
- Bayascas, J.R. 2010. PDK1: the major transducer of PI 3-kinase actions. *Curr Top Microbiol Immunol* 346:9-29.
- Besliu A. 2008. Systemic Lupus Erythematosus: the involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway in cellular cycle and in early apoptosis. *Joint Bone Spine* 75.
- Besliu, A.N., G. Pistol, C.M. Marica, L.M. Banica, C. Chitonu, R. Ionescu, C. Tanaseanu, I. Tamsulea, C. Matache, and M. Stefanescu. 2009. PI3K/Akt signaling in peripheral T lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Roum Arch Microbiol Immunol* 68:69-79.
- Bi, L., I. Okabe, D.J. Bernard, A. Wynshaw-Boris, and R.L. Nussbaum. 1999. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 274:10963-10968.
- Bi, L., I. Okabe, D.J. Bernard, and R.L. Nussbaum. 2002. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* 13:169-172.
- Billottet, C., L. Banerjee, B. Vanhaesebroeck, and A. Khwaja. 2009. Inhibition of class I phosphoinositide 3-kinase activity impairs proliferation and triggers apoptosis in acute promyelocytic leukemia without affecting atra-induced differentiation. *Cancer Research* 69:1027-36.
- Billottet, C., V.L. Grandage, R.E. Gale, A. Quattropiani, C. Rommel, B. Vanhaesebroeck, and A. Khwaja. 2006. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VPI6. *Oncogene* 25:6648-59.
- Blank, M.C., R.N. Stefanescu, E. Masuda, F. Marti, P.D. King, P.B. Redecha, R.J. Wurzbarger, M.G. Peterson, S. Tanaka, and L. Pricop. 2005. Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet* 117:220-227.
- Blasini, A.M., V. Brundula, M. Paris, L. Rivas, S. Salazar, I.L. Stekman, and M.A. Rodriguez. 1998. Protein tyrosine kinase activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 11:387-393.
- Borlado, L.R., A.C. Redondo, B. Alvarez, C. Jimenez, L.M. Criado, J. Flores, M.A. Marcos, A.C. Martinez, D. Balomenos, and A.C. Carrera. 2000b. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *Faseb J* 14:895-903.
- Boyle, K.B., D. Gyori, A. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek, P.R. Taylor, A. Mocsai, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. 2011. Class IA phosphoinositide 3-kinase beta and delta regulate neutrophil oxidase activation in response to *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Immunol* 186:2978-2989.

- Braga, M., C. Quecchia, E. Cavallucci, L. Di Giampaolo, C. Schiavone, C. Petrarca, and M. Di Gioacchino. 2011. T regulatory cells in allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24:55S-64S.
- Brenner, D., P.H. Krammer, and R. Arnold. 2008. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:52-64.
- Brunert, D., K. Klasen, E.A. Corey, and B.W. Ache. 2010. PI3Kgamma-dependent signaling in mouse olfactory receptor neurons. *Chem Senses* 35:301-308.
- Cain, R.J., and A.J. Ridley. 2009. Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 101:13-29.
- Cancro, M.P., D.P. D'Cruz, and M.A. Khamashta. 2009. The role of B lymphocyte stimulator (BLyS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 119:1066-1073.
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655-1657.
- Cantrell, D.A. 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105:369-374.
- Caricchio, R., L. McPhie, and P.L. Cohen. 2003. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *J Immunol* 171:5778-5786.
- Chiarini D. 2009. Dual inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a new therapeutic option for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*. 69:3520-8.
- Chua, B.T., D. Gallego-Ortega, A. Ramirez de Molina, A. Ullrich, J.C. Lacal, and J. Downward. 2009. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer* 8:131.
- Chua, B.T., D. Gallego-Ortega, A. Ramirez de Molina, A. Ullrich, J.C. Lacal, and J. Downward. 2009. Regulation of Akt(ser473) phosphorylation by choline kinase in breast carcinoma cells. *Mol Cancer* 8:131.
- Clark, E.A., and P.J. Lane. 1991. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annu Rev Immunol* 9:97-127.
- Clayton, E, Bardi, G, Bell, SE, Chantry, D, Downes, CP, Gray, A, Humphries, LA, Rawlings, D, Reynolds, H, Vigorito, E, Turner, M. 2002. A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med*:196(6):753-63.
- Crispin JC, Tsokos GC. 2008. Novel molecular targets in the treatment of systemic lupus Erythematosus. *Autoimmun Rev*.7:256-61.
- Crispin, J.C., A. Martinez, and J. Alcocer-Varela. 2003. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21:273-276.
- Crispin, J.C., M. Oukka, G. Bayliss, R.A. Cohen, C.A. Van Beek, I.E. Stillman, V.C. Kytтары, Y.T. Juang, and G.C. Tsokos. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 181:8761-8766.
- Crispin, J.C., V.C. Kytтары, C. Terhorst, and G.C. Tsokos. 2010. T cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 6:317-325.
- Crispin, J.C., and G.C. Tsokos. 2010. IL-17 in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*:943254.
- Cui, H.D., Z.M. Qi, L.L. Yang, L. Qi, N. Zhang, X.L. Zhang, S.Y. Du, and Y. Jiang. 2011. Interleukin-10 receptor expression and signalling were down-regulated in CD4 T cells of lupus nephritis patients. *Clin Exp Immunol* 165:163-171.
- da Silva AJ, Raab M, Li Z, Rudd CE. TcR zeta/CD3 signal transduction in T-cells: downstream signalling via ZAP-70, SLP-76 and FYB. *Biochem Soc Trans*. 1997 May;25(2):361-6
- Damilano, F., A. Perino, and E. Hirsch. 2010. PI3K kinase and scaffold functions in heart. *Ann N and Acad Sci* 1188:39-45.
- Das, M., E. Scappini, N.P. Martin, K.A. Wong, S. Dunn, Y.J. Chen, S.L. Miller, J. Domin, and J.P. O'Bryan. 2007. Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3'-kinase C2beta-AKT pathway. *Mol Cell Biol* 27:7906-7917.
- D'Cruz, D.P. 2007. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369: 587-96.
- de Faucal, P., A. Godard, M.A. Peyrat, J.F. Moreau, and J.P. Soulillou. 1984. Impaired IL2 production by lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Immunol (Paris)* 135D:161-172.
- Deane, J.A., M.G. Kharas, J.S. Oak, L.N. Stiles, J. Luo, T.I. Moore, H. Ji, C. Rommel, L.C. Cantley, T.E. Lane, and D.A. Fruman. 2007. T-cell function is partially maintained in the absence of class IA phosphoinositide 3-kinase signaling. *Blood* 109:2894-2902.
- Deane, J.A., and D.A. Fruman. 2004. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22:563-598.
- Del Prete, A., W. Vermi, E. Dander, K. Otero, L. Barberis, W. Luini, S. Bernasconi, M. Sironi, A. Santoro, C. Garlanda, F. Facchetti, M.P. Wymann, A. Vecchi, E. Hirsch, A. Mantovani, and S. Sozzani. 2004. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *Embo J* 23:3505-3515.
- Deora, A.A., T. Win, B. Vanhaesebroeck, and H.M. Lander. 1998. A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *J Biol Chem* 273:29923-29928.
- Desai-Mehta, A., L. Lu, R. Ramsey-Goldman, and S.K. Datta. 1996. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 97:2063-2073.
- Di Cristofano, A., P. Kotsi, Y. Peng, C. Cordon-Cardo, K. Elkon, and P. Pandolfi. 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten+/- mice. *Science* 285:2122-2125.
- Dil, N., and A.J. Marshall. 2009. Role of phosphoinositide 3-kinase p110 delta in TLR4- and TLR9-mediated B cell cytokine production and differentiation. *Mol Immunol* 46:1970-1978.

- Dölff, S., M. Bijl, M.G. Huitema, P.C. Limburg, C.G. Kallenberg, and W.H. Abdulahad. 2011. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 141:197-204.
- Domin, J., L. Harper, D. Aubyn, M. Wheeler, O. Florey, D. Haskard, M. Yuan, and D. Zicha. 2005. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. *J Cell Physiol* 205:452-462.
- Dominguez, V., C. Raimondi, S. Somanath, M. Bugliani, M.K. Loder, C.E. Edling, N. Divecha, G. da Silva-Xavier, L. Marselli, S.J. Persaud, M.D. Turner, G.A. Rutter, P. Marchetti, M. Falasca, and T. Maffucci. 2011. Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 286:4216-4225.
- Dong LQ. 2005. DK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E187-E196.
- Dos Santos, S., A.I. Delattre, F. De Longueville, H. Bult, and M. Raes. 2007. Gene expression profiling of LPS-stimulated murine macrophages and role of the NF-kappaB and PI3K/mTOR signaling pathways. *Ann N and Acad Sci* 1096:70-77.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22.
- Dufner, A., and G. Thomas. 1999. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 253:100-109.
- Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain. 1998. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16:201-223.
- Duty, J.A., P. Szodoray, N.Y. Zheng, K.A. Koelsch, Q. Zhang, M. Swiatkowski, M. Mathias, L. Garman, C. Helms, B. Nakken, K. Smith, A.D. Farris, and P.C. Wilson. 2009. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 206:139-151.
- Eickholt, B.J., A.I. Ahmed, M. Davies, E.A. Papakonstanti, W. Pearce, M.L. Starkey, A. Bilancio, A.C. Need, A.J. Smith, S.M. Hall, F.P. Hamers, K.P. Giese, E.J. Bradbury, and B. Vanhaesebroeck. 2007. Control of axonal growth and regeneration of sensory neurons by the p110delta PI 3-kinase. *PLoS One* 2:e869.
- Eischen, C.M., B.L. Williams, W. Zhang, L.E. Samelson, D.H. Lynch, R.T. Abraham, P.J. Leibson. 1997. ZAP-70 tyrosine kinase is required for the up-regulation of Fas ligand in activation-induced T cell apoptosis. *J Immunol* 159: 1135-9.
- Elis, W., E. Triantafellow, N.M. Wolters, K.R. Sian, G. Caponigro, J. Borawski, L.A. Gaither, L.O. Murphy, P.M. Finan, and J.P. Mackeigan. 2008. Down-regulation of class II phosphoinositide 3-kinase alpha expression below a critical threshold induces apoptotic cell death. *Mol Cancer Res* 6:614-623.
- Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7:606-619.
- Enyedy, E.J., J.P. Mitchell, M.P. Nambiar, and G.C. Tsokos. 2001. Defective FcgammaRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 101:130-135.
- Enyedy, E.J., M.P. Nambiar, S.N. Liossis, G. Dennis, G.M. Kammer, and G.C. Tsokos. 2001. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:1114-1121.
- Falasca, M., W.E. Hughes, V. Dominguez, G. Sala, F. Fostira, M.Q. Fang, R. Cazzolli, P.R. Shepherd, D.E. James, and T. Maffucci. 2007. The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J Biol Chem* 282:28226-28236.
- Farber, E. 1994. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 7:605-609.
- Fatenejad, S., S. Peng, O. Disorbo, and J. Craft. 1998. Central T cell tolerance in lupus-prone mice: influence of autoimmune background and the lpr mutation. *J Immunol* 161:6427-6432.
- Fathman, C.G., and N.B. Lineberry. 2007. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 7:599-609.
- Fayard, E., J. Gill, M. Paolino, D. Hynx, G.A. Hollander, and B.A. Hemmings. 2007. Deletion of PKBalpha/Akt1 affects thymic development. *PLoS One* 2:e992.
- Fields, P.E., T.F. Gajewski, and F.W. Fitch. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271:1276-1278.
- Flores-Borja, F., P.S. Kabouridis, E.C. Jury, D.A. Isenberg, and R.A. Mageed. 2007. Altered lipid raft-associated proximal signaling and translocation of CD45 tyrosine phosphatase in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56:291-302.
- Floto, R.A., M.R. Clatworthy, K.R. Heilbronn, D.R. Rosner, P.A. MacAry, A. Rankin, P.J. Lehner, W.H. Ouwehand, J.M. Allen, N.A. Watkins, and K.G. Smith. 2005. Loss of function of a lupus-associated FcgammaRIIb polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med* 11:1056-1058.
- Fortin, C.F., A. Cloutier, T. Ear, S. Sylvain-Prevost, T.Z. Mayer, R. Bouchelaghem, and P.P. McDonald. 2011. A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils. *Eur J Immunol* 41:1709-1719.
- Frey, R.S., X. Gao, K. Javai, S.S. Siddiqui, A. Rahman, and A.B. Malik. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling through protein kinase Czeta induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 281:16128-16138.
- Fritsch, R.D., X. Shen, G.G. Illei, C.H. Yarboro, C. Prussin, K.S. Hathcock, R.J. Hodes, and P.E. Lipsky. 2006. Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2184-2197.

- Fruman, D., R. Meyers, and L. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67:481-507.
- Fruman, D., and G. Bismuth. 2009. Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol Rev* 228:253-272.
- Fruman, D.A. 2004. Towards an understanding of isoform specificity in phosphoinositide 3-kinase signalling in lymphocytes. *Biochem Soc Trans* 32:315-319.
- Fruman, D.A., S.B. Snapper, C.M. Yballe, L. Davidson, J.Y. Yu, F.W. Alt, and L.C. Cantley. 1999. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 283:393-397.
- Fruman, D.A., and L.C. Cantley. 2002. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Seminars in immunology* 14:7-18.
- Gadue, P., N. Morton, and P.L. Stein. 1999. The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *J Exp Med* 190:1189-1196.
- Garcon, F., D.T. Patton, J.L. Emery, E. Hirsch, R. Rottapel, T. Sasaki, and K. Okkenhaug. 2008. CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* 111:1464-1471.
- Gil, D., W.W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901-912.
- Gill JM. 2003. Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *AMERICAN FAMILY PHYSICIAN*, volumen 68, Number 11
- Gomez-Rodriguez, J., J.A. Readinger, I.C. Viorritto, K.L. Mueller, R.A. Houghtling, and P.L. Schwartzberg. 2007. Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol Rev* 218:45-64.
- González-García, A., L. R-Borlado, E. Leonardo, I. Mérida, C. Martínez-A, A.C. Carrera. 1997. Lck is necessary and sufficient for Fas-ligand expression and apoptotic cell death in mature cycling T cells. *J Immunol* 158:4104-12.
- Goodnow, C.C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2264-2271.
- Goodnow, C.C., R. Brink, and E. Adams. 1991. Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature* 352:532-536.
- Gorelik, G., J.Y. Fang, A. Wu, A.H. Sawalha, and B. Richardson. 2007. Impaired T cell protein kinase C delta activation decreases ERK pathway signaling in idiopathic and hydralazine-induced lupus. *J Immunol* 179:5553-5563.
- Gregersen P.K., and T.W. Behrens. 2006. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* 7:917-928.
- Guillermet-Guibert, J., K. Bjorklof, A. Salpekar, C. Gonella, F. Ramadani, A. Bilancio, S. Meek, A.J. Smith, K. Okkenhaug, and B. Vanhaesebroeck. 2008. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8292-8297.
- Gupta, M., S.R. Dillon, S.C. Ziesmer, A.L. Feldman, T.E. Witzig, S.M. Ansell, J.R. Cerhan, and A.J. Novak. 2009. A proliferation-inducing ligand mediates follicular lymphoma B-cell proliferation and cyclin D1 expression through phosphatidylinositol 3-kinase-regulated mammalian target of rapamycin activation. *Blood* 113:5206-5216.
- Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 205:565-574.
- Hayer, S., N. Pundt, M.A. Peters, C. Wunrau, I. Kuhnle, K. Neugebauer, S. Strietholt, J. Zwerina, A. Korb, J. Penninger, L.A. Joosten, S. Gay, T. Ruckle, G. Schett, and T. Pap. 2009. PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:4288-4298.
- Hayer, S., N. Pundt, M.A. Peters, C. Wunrau, I. Kuhnle, K. Neugebauer, S. Strietholt, J. Zwerina, A. Korb, J. Penninger, L.A. Joosten, S. Gay, T. Ruckle, G. Schett, and T. Pap. 2009. PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:4288-4298.
- Haylock-Jacobs, S., I. Comerford, M. Bunting, E. Kara, S. Townley, M. Klingler-Hoffmann, B. Vanhaesebroeck, K.D. Puri, and S.R. McColl. 2011. PI3Kdelta drives the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting effector T cell apoptosis and promoting Th17 differentiation. *J Autoimmun* 36:278-287.
- Henley, T., D. Kovesdi, and M. Turner. 2008. B-cell responses to B-cell activation factor of the TNF family (BAFF) are impaired in the absence of PI3K delta. *Eur J Immunol* 38:3543-3548.
- Hers, I., E.E. Vincent, and J.M. Tavaré. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23:1515-1527.
- Hiles, I.D., M. Otsu, S. Volinia, M.J. Fry, I. Gout, R. Dhand, G. Panayotou, F. Ruiz-Larrea, A. Thompson, N.F. Totty, J.J. Hsuan, S.A. Courtneidge, P.J. Parker, and M.D. Waterfield. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70:419-429.
- Hirsch, E., V.L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, and M.P. Wymann. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287:1049-1053.
- Jimenez, C., C. Hernandez, B. Pimentel, and A.C. Carrera. 2002. The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* 277:41556-41562.

- Jou, S.T., N. Carpino, Y. Takahashi, R. Piekorz, J.R. Chao, D. Wang, and J.N. Ihle. 2002. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 22:8580-8591.
- Juang, Y.T., Y. Wang, G. Jiang, H.B. Peng, S. Ergin, M. Finnell, A. Magilavy, V.C. Kyttaris, and G.C. Tsokos. 2008. PP2A dephosphorylates Elf-1 and determines the expression of CD3zeta and FcRgamma in human systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 181:3658-3664.
- Jury, E.C., F. Flores-Borja, H.S. Kalsi, M. Lazarus, D.A. Isenberg, C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2010. Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 40:569-578.
- Jury, E.C., P.S. Kabouridis, A. Abba, R.A. Mageed, and D.A. Isenberg. 2003. Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:1343-1354.
- Jury, E.C., P.S. Kabouridis, A. Abba, R.A. Mageed, and D.A. Isenberg. 2003. Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:1343-1354.
- Kammer, G.M., I.U. Khan, and C.J. Malemud. 1994. Deficient type I protein kinase A isozyme activity in systemic lupus erythematosus T lymphocytes. *J Clin Invest* 94:422-430.
- Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A.A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M.G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci, and E. Farber. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21:165-170.
- Kang, S., J. Song, J. Kang, H. Kang, D. Lee, Y. Lee, and D. Park. 2005. Suppression of the alpha-isoform of class II phosphoinositide 3-kinase gene expression leads to apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 329:6-10.
- Katsiari, C.G., V.C. Kyttaris, Y.T. Juang, and G.C. Tsokos. 2005. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 115:3193-3204.
- Kim, N., A. Saudemont, L. Webb, M. Camps, T. Ruckle, E. Hirsch, M. Turner, and F. Colucci. 2007. The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* 110:3202-3208.
- Kinashi, T., K. Katagiri, S. Watanabe, B. Vanhaesebroeck, J. Downward, and K. Takatsu. 2000. Distinct mechanisms of alpha 5beta 1 integrin activation by Ha-Ras and R-Ras. *J Biol Chem* 275:22590-22596.
- Kojima, K., M. Shimanuki, M. Shikami, I.J. Samudio, V. Ruvo, P. Corn, N. Hanaoka, M. Konopleva, M. Andreeff, and H. Nakakuma. 2008. The dual PI3 kinase/mTOR inhibitor PI-103 prevents p53 induction by Mdm2 inhibition but enhances p53-mediated mitochondrial apoptosis in p53 wild-type AML. *Leukemia* 22:1728-36.
- Kok, K., B. Geering, and B. Vanhaesebroeck. 2009a. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 34:115-127.
- Kok, K., G.E. Nock, E.A. Verrall, M.P. Mitchell, D.W. Hommes, M.P. Peppelenbosch, and B. Vanhaesebroeck. 2009b. Regulation of p110delta PI 3-kinase gene expression. *PLoS One* 4:e5145.
- Kondelkova, K., D. Vokurkova, J. Krejsek, L. Borska, Z. Fiala, and A. Ctirad. 2010. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 53:73-77.
- Korganow, A.S., A.M. Knapp, H. Nehme-Schuster, P. Soulas-Sprauel, V. Poindron, J.L. Pasquali, and T. Martin. 2010. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J Autoimmun* 34:426-434.
- Kouroumalis, A., R.J. Nibbs, H. Aptel, K.L. Wright, G. Kolios, and S.G. Ward. 2005. The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. *J Immunol* 175:5403-5411.
- Kovacs, B., D. Vassilopoulos, S. Vogelgesang, and G. Tsokos. 1996. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* 81:293-302.
- Kovacs, B., S.N. Liossis, G.J. Dennis, and G.C. Tsokos. 1997. Increased expression of functional Fas-ligand in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 25:213-221.
- Krammer, P., R. Arnold, and I. Lavrik. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7:532-542.
- Krasilnikov, M.A. 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)* 65:59-67.
- Krishnamoorthy, N., T.B. Oriss, M. Paglia, M. Fei, M. Yarlagadda, B. Vanhaesebroeck, A. Ray, and P. Ray. 2008. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* 14:565-573.
- Krishnan, S., M.P. Nambiar, V.G. Warke, C.U. Fisher, J. Mitchell, N. Delaney, and G.C. Tsokos. 2004. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 172:7821-7831.
- Krishnan, S., Y. Juang, B. Chowdhury, A. Magilavy, C. Fisher, H. Nguyen, M. Nambiar, V. Kyttaris, A. Weinstein, R. Bahjat, P. Pine, V. Rus, and G. Tsokos. 2008. Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 181:8145-8152.
- Kuechle, M.K., and K.B. Elkon. 2007. Shining light on lupus and UV. *Arthritis Res Ther* 9:101.
- Kyttaris, V.C., Y. Wang, Y.T. Juang, A. Weinstein, and G.C. Tsokos. 2007. Increased levels of NF-ATc2 differentially

- regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:1960-1966.
- Landolt-Marticorena, C., R. Wither, H. Reich, A. Herzenberg, J. Scholey, D.D. Gladman, M.B. Urowitz, P.R. Fortin, and J. Wither. 2011. Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B cells in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 38:642-651.
 - LaSalle, J.M., and D.A. Hafler. 1994. T cell anergy. *The FASEB Journal* 8:601-8.
 - Le Buanec, H., M.L. Gougeon, A. Mathian, P. Lebon, J.M. Dupont, G. Peltre, P. Hemon, M. Schmid, B. Bizzini, T. Kunding, A. Burny, A. Bensussan, Z. Amoura, R.C. Gallo, and D. Zagury. 2011. IFN-alpha and CD46 stimulation are associated with active lupus and skew natural T regulatory cell differentiation to type 1 regulatory T (Tr1) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18995-19000.
 - Lehmann, P., and B. Homey. 2009. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 8:456-461.
 - Lenert G and Lenert P. 1996. CD4-reactive antibodies in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 49:113-21.
 - Leverrier, Y., K Okkenhaug, C Sawyer, A Bilancio, B Vanhaesebroeck and AJ Ridley. 2003. Class I phosphoinositide 3-kinase p110beta is required for apoptotic cell and Fcgamma receptor-mediated phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem* 278:38437-42
 - Li, N., K. Nakamura, Y. Jiang, H. Tsurui, S. Matsuoka, M. Abe, M. Ohtsuji, H. Nishimura, K. Kato, T. Kawai, T. Atsumi, T. Koike, T. Shirai, H. Ueno, and S. Hirose. 2004. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:171-179.
 - Li, W., C.D. Whaley, A. Mondino, and D.L. Mueller. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271:1272-1276.
 - Li, Y., T. Harada, Y.T. Juang, V.C. Kyttaris, Y. Wang, M. Zidanic, K. Tung, and G.C. Tsokos. 2007. Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:1938-1947.
 - Liang, J., and J.M. Slingerland. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339-345.
 - Liang, L.Q., Z.P. Zhan, H.S. Xu, X.Y. Yang, Y.J. Ye, F. Lian, and Q. Qiu. 2008. [Abnormal signaling activity of phosphatidylinositol 3-kinase pathway in peripheral blood T cells from patients with systemic lupus erythematosus]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88:2036-2040.
 - Lieberman, L.A., and G.C. Tsokos. 2010. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* 2010:740619.
 - Liossis, S.N., B. Kovacs, G. Dennis, G.M. Kammer, and G.C. Tsokos. 1996. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* 98:2549-2557.
 - Liossis, S.N., X.Z. Ding, G.J. Dennis, and G.C. Tsokos. 1998. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101:1448-1457.
 - Liu, D., T. Zhang, A.J. Marshall, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, and J.E. Uzonna. 2009. The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to *Leishmania major* by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J Immunol* 183:1921-1933.
 - Liu, H., and R.M. Pope. 2003. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 3:317-322.
 - Liu, M.F., H.S. Liu, C.R. Wang, and H.Y. Lei. 1998. Expression of CTLA-4 molecule in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 18:392-398.
 - Liu, P., H. Cheng, T.M. Roberts, and J.J. Zhao. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627-644.
 - Liu, Y., Y. He, J. Zhang, L. Jiang, S. Liu, and D. Zheng. 2003. Tyrosine mutation in CD3epsilon-ITAM blocked T lymphocyte apoptosis mediated by CD3epsilon. *Immunol Invest* 32:59-70.
 - Low, P.C., R. Misaki, K. Schroder, A.C. Stanley, M.J. Sweet, R.D. Teasdale, B. Vanhaesebroeck, F.A. Meunier, T. Taguchi, and J.L. Stow. 2010. Phosphoinositide 3-kinase delta regulates membrane fission of Golgi carriers for selective cytokine secretion. *J Cell Biol* 190:1053-1065.
 - Macian, F., F. Garcia-Cozar, S.H. Im, H.F. Horton, M.C. Byrne, and A. Rao. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109:719-731.
 - Mackay, M., A. Stanevsky, T. Wang, C. Aranow, M. Li, S. Koenig, J.V. Ravetch, and B. Diamond. 2006. Selective dysregulation of the FcgammaRIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* 203:2157-2164.
 - Mader, R., S. Mishail, M. Adawi, I. Lavi, and R. Luboshitzky. 2007. Thyroid dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): relation to disease activity. *Clin Rheumatol* 26:1891-1894.
 - Maehama, T., and J.E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273:13375-13378.
 - Maffucci, T., F.T. Cooke, F.M. Foster, C.J. Traer, M.J. Fry, and M. Falasca. 2005. Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol* 169:789-799.
 - Majolini, M.B., M.M. D'Elisio, P. Galieni, M. Boncristiano, F. Lauria, G. Del Prete, J.L. Telford, and C.T. Baldari. 1998. Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia

- B cells. Blood* 91:3390-3396.
- McInnes, I.B., and G. Schett. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205-2219.
 - Messner, R.P., F.D. Lindstrom, and R.C. Williams, Jr. 1973. Peripheral blood lymphocyte cell surface markers during the course of systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 52:3046-3056.
 - Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debre, J.C. Piette, and G. Gorochov. 2005. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175:8392-8400.
 - Miyara, M., Z. Amoura, C. Parizot, C. Badoual, K. Dorgham, S. Trad, D. Nochy, P. Debre, J.C. Piette, and G. Gorochov. 2005. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175:8392-8400.
 - Molad, Y., M. Amit-Vasina, O. Bloch, E. Yona, and M.J. Rapoport. 2010. Increased ERK and JNK activities correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 69:175-180.
 - Mueller, D.L. 2004. E3 ubiquitin ligases as T cell anergy factors. *Nat Immunol* 5:883-890.
 - Nalbandian, A., J.C. Crispin, and G.C. Tsokos. 2009. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol* 157:209-215.
 - Nambiar, M., C. Fisher, A. Kumar, C. Tsokos, V. Warke, and G. Tsokos. 2003. Forced expression of the Fc receptor gamma-chain renders human T cells hyperresponsive to TCR/CD3 stimulation. *J Immunol* 170:2871-2876.
 - Nashed, B.F., T. Zhang, M. Al-Alwan, G. Srinivasan, A.J. Halayko, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, K.T. Hayglass, and A.J. Marshall. 2007. Role of the phosphoinositide 3-kinase p110delta in generation of type 2 cytokine responses and allergic airway inflammation. *Eur J Immunol* 37:416-424.
 - Neidhart, M., F. Pataki, B.A. Michel, and K. Fehr. 1996. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ peripheral blood T-lymphocytes is related to auto-immune processes and hematological manifestations in systemic lupus erythematosus. *Schweiz Med Wochenschr* 126:1922-1925.
 - h, P.a.S., R. 2009. Systemic Lupus Erythematosus. In *Pediatric Nephrology*. E. Avner, editor Springer, Wisconsin. 26.
 - Okkenhaug, K., A. Bilancio, G. Farjot, H. Priddle, S. Sancho, E. Peskett, W. Pearce, S.E. Meek, A. Salpekar, M.D. Waterfield, A.J. Smith, and B. Vanhaesebroeck. 2002. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297:1031-1034.
 - Okkenhaug, K., A. Bilancio, J.L. Emery, and B. Vanhaesebroeck. 2004. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Biochem Soc Trans* 32:332-335.
 - Okkenhaug, K., and B. Vanhaesebroeck. 2003. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 3:317-330.
 - Oliver, J.M., D.L. Burg, B.S. Wilson, J.L. McLaughlin, and R.L. Geahlen. 1994. Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J Biol Chem* 269:29697-29703.
 - Otero, D.C., S.A. Omori, and R.C. Rickert. 2001. Cd19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. *J Biol Chem* 276:1474-1478.
 - Papakonstanti, E.A., O. Zwaenepoel, A. Bilancio, E. Burns, G.E. Nock, B. Houseman, K. Shokat, A.J. Ridley, and B. Vanhaesebroeck. 2008. Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci* 121:4124-4133.
 - Park, S.J., K.S. Lee, S.R. Kim, K.H. Min, H. Moon, M.H. Lee, C.R. Chung, H.J. Han, K.D. Puri, and Y.C. Lee. 2010. Phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor suppresses interleukin-17 expression in a murine asthma model. *Eur Respir J* 36:1448-1459.
 - Parry, R.V., J.M. Chemnitz, K.A. Frauwirth, A.R. Lanfranco, I. Braunstein, S.V. Kobayashi, P.S. Linsley, C.B. Thompson, and J.L. Riley. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25:9543-9553.
 - Parsons, M.J., R.G. Jones, M.S. Tsao, B. Odermatt, P.S. Ohashi, and J.R. Woodgett. 2001. Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cell homeostasis and promotes inflammation. *J Immunol* 167:42-48.
 - Patton, D.T., O.A. Garden, W.P. Pearce, L.E. Clough, C.R. Monk, E. Leung, W.C. Rowan, S. Sancho, L.S. Walker, B. Vanhaesebroeck, and K. Okkenhaug. 2006. Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177:6598-6602.
 - Paty, J.G., Jr., C.W. Sienknecht, A.S. Townes, A.S. Hanissian, J.B. Miller, and A.T. Masi. 1975. Impaired cell-mediated immunity in systemic lupus erythematosus (SLE). A controlled study of 23 untreated patients. *Am J Med* 59:769-779.
 - Peng, X.B., and Y. Deng. 2009. [Expression of transcription factors T-bet and GATA-3 in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 29:2138-2139.
 - Perino, A., A. Ghigo, E. Ferrero, F. Morello, G. Santulli, G.S. Baillie, F. Damilano, A.J. Dunlop, C. Pawson, R. Walser, R. Levi, F. Altruda, L. Silengo, L.K. Langeberg, G. Neubauer, S. Heymans, G. Lembo, M.P. Wymann, R. Wetzker, M.D. Houslay, G. Iaccarino, J.D. Scott, and E. Hirsch. 2011. Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell* 42:84-95.
 - Perl, A. 2010. Systems biology of lupus: mapping the impact of genomic and environmental factors on gene

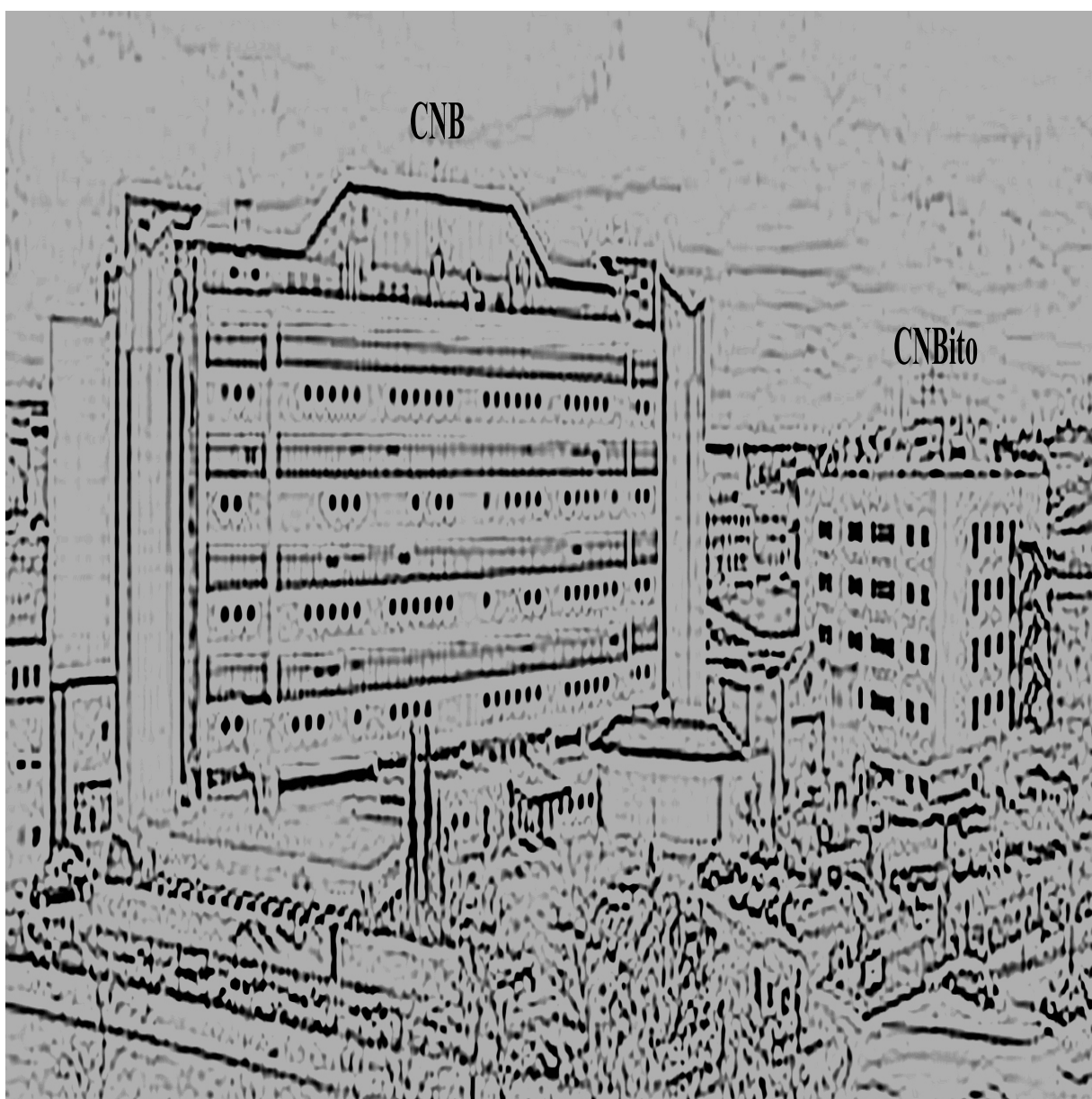
- expression signatures, cellular signaling, metabolic pathways, hormonal and cytokine imbalance, and selecting targets for treatment. *Autoimmunity* 43:32-47.
- Perl, A., P. Gergely, Jr., and K. Banki. 2004. Mitochondrial dysfunction in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 23:293-313.
 - Pesesse, X., C. Moreau, A.L. Drayer, R. Woscholski, P. Parker, and C. Erneux. 1998. The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity. *FEBS Lett* 437:301-303.
 - Pomel, V., J. Klicic, D. Covini, D.D. Church, J.P. Shaw, K. Roulin, F. Burgat-Charvillon, D. Valognes, M. Camps, C. Chabert, C. Gillieron, B. Françon, D. Perrin, D. Leroy, D. Gretener, A. Nichols, P.A. Vitte, S. Carboni, C. Rommel, M.K. Schwarz, and T. Rückle. 2006. Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of PI3K. *J. Med. Chem.* 49:3857-3871.
 - Quignard, J.F., J. Mironneau, V. Carricaburu, B. Fournier, A. Babich, B. Nurnberg, C. Mironneau, and N. Macrez. 2001. Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J Biol Chem* 276:32545-32551.
 - Rahman A, Isenberg DA. 2008. Systemic lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 358:929-39.
 - Ramadani, F., D.J. Bolland, F. Garcon, J.L. Emery, B. Vanhaesebroeck, A.E. Corcoran, and K. Okkenhaug. 2010. The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal* 3:ra60.
 - Randis, T.M., K.D. Puri, H. Zhou, and T.G. Diacovo. 2008. Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol* 38:1215-1224.
 - Rathmell, J., R. Elstrom, R. Cinalli, and C. Thompson. 2003. Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma. *Eur J Immunol* 33:2223-2232.
 - Rauen, T., K. Benedyk, Y.T. Juang, C. Kerkhoff, V.C. Kyttaris, J. Roth, G.C. Tsokos, and K. Tenbrock. 2011. A novel intronic cAMP response element modulator (CREM) promoter is regulated by activator protein-1 (AP-1) and accounts for altered activation-induced CREM expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem* 286:32366-32372.
 - Reynolds, L.F., L.A. Smyth, T. Norton, N. Freshney, J. Downward, D. Kioussis, and V.L. Tybulewicz. 2002. Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 195:1103-1114.
 - Rittenhouse SE. 1996. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood*. 88:4401-14
 - Rodriguez-Viciana, P., P.H. Warne, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield, and J. Downward. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J* 15:2442-2451.
 - Rolf, J., S.E. Bell, D. Kovesdi, M.L. Janas, D.R. Soond, L.M. Webb, S. Santinelli, T. Saunders, B. Hebeis, N. Killeen, K. Okkenhaug, and M. Turner. 2010. Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol* 185:4042-4052.
 - Romagnani, S. 2001. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1:73-78.
 - Rordorf-Nikolic, T., D.J. Van Horn, D. Chen, M.F. White, and J.M. Backer. 1995. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* 270:3662-3666.
 - Rubio, I., P. Rodriguez-Viciana, J. Downward, and R. Wetzker. 1997. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J* 326 (Pt 3):891-895.
 - Rubtsov, A.V., K. Rubtsova, J.W. Kappler, and P. Marrack. 2010. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev* 9:494-498.
 - Sadhu, C., B. Masinovsky, K. C. Dick, G. Sowell, and D. E. Staunton. 2003. Essential role of PI3K in neutrophil directional movement. *J. Immunol.* 170: 2647-2654.
 - Sahuquillo, AG., A. Roumier, E. Teixeira, R. Bragado, and B. Alarcon. 1998. T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3-zeta association. *J Exp Med* 187:1179-92.
 - Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
 - Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R. Jones, A. Oliveira-dos-Santos, W. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T. Mak, P. Ohashi, A. Suzuki, and J. Penninger. 2000. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287:1040-1046.
 - Saudemont, A., F. Garcon, H. Yadi, M. Roche-Molina, N. Kim, A. Segonds-Pichon, A. Martin-Fontecha, K. Okkenhaug, and F. Colucci. 2009. p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5795-5800.
 - Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z.A. Knight, B.S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K.M. Shokat, A.G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7797-7802.
 - Scharenberg, A.M., O. El-Hillal, D.A. Fruman, L.O. Beitz, Z. Li, S. Lin, I. Gout, L.C. Cantley, D.J. Rawlings, and J.P. Kinet. 1998. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo J* 17:1961-1972.

- Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305-334.
- Schymeinsky, J., C. Then, A. Sindrilaru, R. Gerstl, Z. Jakus, V.L. Tybulewicz, K. Scharffetter-Kochanek, and B. Walzog. 2007. Syk-mediated translocation of PI3Kdelta to the leading edge controls lamellipodium formation and migration of leukocytes. *PLoS One* 2:e1132.
- Shan X, MJ Czar, SC Bunnell, P Liu, and Liu, PL Schwartzberg and RL Wange. 2000. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol* 20:6945-57.
- Shenoy, N.G., G.J. Gleich, and L.L. Thomas. 2003. Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zeta-dependent pathway. *J Immunol* 171:3734-3741.
- Shimizu, Y., G.A. Van Severen, K.J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345:250-253.
- Shin, M.S., N. Lee, and I. Kang. 2011. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 23:444-448.
- Sibilia J. 2006. Treatment of systemic lupus erythematosus in 2006. *Joint Bone Spine*. 73:591-8
- Simard, J.F., and K.H. Costenbader. 2007. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? *Int J Clin Pract* 61:1170-1180.
- Singhal, E., and P. Sen. 2011. Hepatocyte growth factor-induced c-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway inhibits dendritic cell activation by blocking IkkappaB kinase activity. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1134-1146.
- Smith, A.J., Z. Surviladze, E.A. Gaudet, J.M. Backer, C.A. Mitchell, and B.S. Wilson. 2001. p110beta and p110delta phosphatidylinositol 3-kinases up-regulate Fc(epsilon)RI-activated Ca²⁺ influx by enhancing inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* 276:17213-17220.
- Solomou, E.E., Y.T. Juang, M.F. Gourley, G.M. Kammer, and G.C. Tsokos. 2001. Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166:4216-4222.
- Soond, D.R., E. Bjorgo, K. Moltu, V.Q. Dale, D.T. Patton, K.M. Torgersen, F. Galleway, B. Twomey, J. Clark, J.S. Gaston, K. Tasken, P. Bunyard, and K. Okkenhaug. 2010. PI3K p110delta regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* 115:2203-2213.
- Stephens, L., A. Smrcka, F.T. Cooke, T.R. Jackson, P.C. Sternweis, and P.T. Hawkins. 1994. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 77:83-93.
- Stephens, L., K. Anderson, D. Stokoe, H. Erdjument-Bromage, G.F. Painter, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, F. McCormick, P. Tempst, J. Coadwell, and P.T. Hawkins. 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710-714.
- Stephens, L.R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A.S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst, and P.T. Hawkins. 1997. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89:105-114.
- Suzuki, A., M.T. Yamaguchi, T. Ohteki, T. Sasaki, T. Kaisho, Y. Kimura, R. Yoshida, A. Wakeham, T. Higuchi, M. Fukumoto, T. Tsubata, P.S. Ohashi, S. Koyasu, J.M. Penninger, T. Nakano, and T.W. Mak. 2001. T cell-specific loss of Pten leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity* 14:523-534.
- Takeuchi, T., M. Pang, K. Amano, J. Koide, and T. Abe. 1997. Reduced protein tyrosine phosphatase (PTPase) activity of CD45 on peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 109:20-26.
- Tamura, N., K. Hazeki, N. Okazaki, Y. Kametani, H. Murakami, Y. Takaba, Y. Ishikawa, K. Nigorikawa and O. Hazeki. 2009. Specific role of phosphoinositide 3-kinase p110alpha in the regulation of phagocytosis and pinocytosis in macrophages. *Biochem J* 423:99-108.
- Tan, J., T. Town, L. Abdullah, Y. Wu, A. Placzek, B. Small, J. Kroeger, F. Crawford, D. Richards, and M. Mullan. 2002. CD45 isoform alteration in CD4⁺ T cells as a potential diagnostic marker of Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology* 132:164-172.
- Tanaka, S., T. Matsuyama, A.D. Steinberg, S.F. Schlossman, and C. Morimoto. 1989. Antilymphocyte antibodies against CD4⁺2H4⁺ cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32:398-405.
- Tanemura, S., H. Momose, N. Shimizu, D. Kitagawa, J. Seo, T. Yamasaki, K. Nakagawa, H. Kajiho, J.M. Penninger, T. Katada, and H. Nishina. 2009. Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *J Biochem* 145:345-354.
- Tang, H., G. Tan, Q. Guo, R. Pang, and F. Zeng. 2009. Abnormal activation of the Akt-GSK3beta signaling pathway in peripheral blood T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Cycle* 8:2789-2793.
- Tanigawa, T., S. Araki, A. Nakata, F. Kitamura, M. Yasumoto, S. Sakurai, and T. Kiuchi. 1998. Increase in memory (CD4⁺CD29⁺ and CD4⁺CD45RO⁺) T and naive (CD4⁺CD45RA⁺) T-cell subpopulations in smokers. *Arch Environ Health* 53:378-383.
- Tenbrock, K., Y.T. Juang, V.C. Kyttaris, and G.C. Tsokos. 2007. Altered signal transduction in SLE T cells. *Rheumatology (Oxford)* 46:1525-1530.
- Thomas, M.S., J.S. Mitchell, C.C. DeNucci, A.L. Martin, and Y. Shimizu. 2008. The p110gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase regulates migration of effector CD4 T lymphocytes into peripheral inflammatory

- sites. *J Leukoc Biol* 84:814-823.
- Tomlinson, M.G., V.L. Heath, C.W. Turck, S.P. Watson, and A. Weiss. 2004. SHIP family inositol phosphatases interact with and negatively regulate the Tec tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279:55089-55096.
 - Topham, M.K., and S.M. Prescott. 2001. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *J Cell Biol* 152:1135-1143.
 - Tsokos, G.C. 2011. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 365:2110-2121.
 - Tsokos, G.C., and S.N. Liossis. 1999. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today* 20:119-124.
 - Uno, J.K., K.N. Rao, K. Matsuoka, S.Z. Sheikh, T. Kobayashi, F. Li, E.C. Steinbach, A.R. Sepulveda, B. Vanhaesebroeck, R.B. Sartor, and S.E. Plevy. 2010. Altered macrophage function contributes to colitis in mice defective in the phosphoinositide-3 kinase subunit p110delta. *Gastroenterology* 139:1642-1653, 1653 e1641-1646.
 - Valencia, X., C. Yarboro, G. Illei, and P.E. Lipsky. 2007. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:2579-2588.
 - Vanhaesebroeck B and Waterfield MD. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* Nov 25;253(1):239-54.
 - Vanhaesebroeck, B., S.J. Leever, G. Panayotou, and M.D. Waterfield. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272.
 - Vassilopoulos, D., B. Kovacs, and G.C. Tsokos. 1995. TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 155:2269-2281.
 - Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, and J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55:301-308.
 - Venigalla, R.K., T. Tretter, S. Krienke, R. Max, V. Eckstein, N. Blank, C. Fiehn, A.D. Ho, and H.M. Lorenz. 2008. Reduced CD4+, CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+, CD25high, CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58:2120-2130.
 - Vesosky, B., D.K. Flaherty, and J. Turner. 2006. Th1 cytokines facilitate CD8-T-cell-mediated early resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis* in old mice. *Infect Immun* 74:3314-3324.
 - Vigorito, E., E. Clayton, and M. Turner. 2004. BCR activation of PI3K is Vav-independent in murine B cells. *Biochem Soc Trans* 32:781-784.
 - Voigt, P., M.B. Dorner, and M. Schaefer. 2006. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281:9977-9986.
 - Wallace, D.J., W. Stohl, R.A. Furie, J.R. Lisse, J.D. McKay, J.T. Merrill, M.A. Petri, E.M. Ginzler, W.W. Chatham, W.J. McCune, V. Fernandez, M.R. Chevrier, Z.J. Zhong, and W.W. Freimuth. 2009. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 61:1168-1178.
 - Walmsley, M.J., S.K. Ooi, L.F. Reynolds, S.H. Smith, S. Ruf, A. Mathiot, L. Vanes, D.A. Williams, M.P. Cancro, and V.L. Tybulewicz. 2003. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* 302:459-462.
 - Wang, A., F. Batteux, and E.K. Wakeland. 2010. The role of SLAM/CD2 polymorphisms in systemic autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 22:706-714.
 - Wang, T., H. Zhao, L. Yu, L.J. Chen, X.Y. Fan, C.H. Xie, Y.J. Mei, and Z.J. Li. 2012. [The expression and clinical significance of IL-17AR on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 28:301-303.
 - Watson, M.L., J.K. Rao, G.S. Gilkeson, P. Ruiz, E.M. Eicher, D.S. Pisetsky, A. Matsuzawa, J.M. Rochelle, and M.F. Seldin. 1992. Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J Exp Med* 176:1645-1656.
 - Wells, A.D. 2009. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol* 182:7331-7341.
 - Werner, M., E. Hobeika, and H. Jumaa. 2010. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol Rev* 237:55-71.
 - Whittingham, S. 1988. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Ann Acad Med Singapore* 17:195-200.
 - Windmiller, D.A., and J.M. Backer. 2003. Distinct phosphoinositide 3-kinases mediate mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcepsilonRI receptors. *J Biol Chem* 278:11874-11878.
 - Wolf, H., Y. Muller, S. Salmen, W. Wilmanns, and G. Jung. 1994. Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies. *Eur J Immunol* 24:1410-1417.
 - Wong, C.K., L.C. Lit, L.S. Tam, E.K. Li, P.T. Wong, and C.W. Lam. 2008. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol* 127:385-393.
 - Wong, C.K., P.T. Wong, L.S. Tam, E.K. Li, D.P. Chen, and C.W. Lam. 2009. Activation profile of intracellular mitogen-activated protein kinases in peripheral lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 29:738-746.
 - Wong, H.K., G.M. Kammer, G. Dennis, and G.C. Tsokos. 1999. Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65-RelA protein expression. *J*

- Immunol* 163:1682-1689.
- Wymann, M.P. and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1436, 127-150.
 - Xu, L., L. Zhang, A.M. Bertucci, R.M. Pope, and S.K. Datta. 2008. Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF-kappaB activation pathway. *Immunol Lett* 121:74-83.
 - Xu, L., L. Zhang, Y. Yi, H.K. Kang, and S.K. Datta. 2004. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* 10:411-415.
 - Xu, Y., H. Hortsman, L. Seet, S.H. Wong, and W. Hong. 2001. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* 3:658-666.
 - Yi, Y., M. McNerney, and S.K. Datta. 2000. Regulatory defects in Cbl and mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-related kinase) pathways cause persistent hyperexpression of CD40 ligand in human lupus T cells. *J Immunol* 165:6627-6634.
 - Yoshioka, K., N. Sugimoto, N. Takuwa, and Y. Takuwa. 2007. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 71:912-920.
 - Yu, X.Z., S.D. Levin, J. Madrenas, and C. Anasetti. 2004. Lck is required for activation-induced T cell death after TCR ligation with partial agonists. *J Immunol* 172:1437-1443.
 - Yue, Z., and Y. Zhong. 2010. From a global view to focused examination: understanding cellular function of lipid kinase VPS34-Beclin 1 complex in autophagy. *J Mol Cell Biol* 2:305-307.
 - Yum, H.K., J. Arcaroli, J. Kupfner, R. Shenkar, J.M. Penninger, T. Sasaki, K.Y. Yang, J.S. Park, and E. Abraham. 2001. Involvement of phosphoinositide 3-kinases in neutrophil activation and the development of acute lung injury. *J Immunol* 167:6601-6608.
 - Zhang, J., T. Bardos, K. Mikecz, A. Finnegan, and T.T. Glant. 2001. Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. *J Immunol* 166:4981-4986.
 - Zheng, Y., Y. Zha, and T.F. Gajewski. 2008. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep* 9:50-55.
 - Zhong, L., C. Wu, W. Lee, and C. Liu. 2004. Zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), but not Syk, tyrosine kinase can mediate apoptosis of T cells through the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways. *J Immunol* 172:1472-1482.
 - Zhu, J., and W.E. Paul. 2010. Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 238:247-262.
 - Janeway, C.A., Jr., and R.A. Flavell. 1999. Immunology at Yale. *Immunol Res* 19:105-106.

Anexo



SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX SELENA MODIFICATION

Physicians Global Assessment _____

0 1 2 3
None Mild Med Severe

SLEDAI SCORE

Check box: If descriptor is present at the time of visit or in the proceeding 10 days

Wt	Present	Descriptor	Definition
8	<input type="checkbox"/>	Seizure	Recent onset. Exclude metabolic, infectious or drug cause
8	<input type="checkbox"/>	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Excluded uremia and drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Organic Brain Syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory or other intelligent function, with rapid onset fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least two of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Visual Disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serious exudate or hemorrhages in the choroids, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	<input type="checkbox"/>	Cranial Nerve Disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	<input type="checkbox"/>	Lupus Headache	Severe persistent headache: may be migrainous, but must be non-responsive to narcotic analgesia.
8	<input type="checkbox"/>	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis
8	<input type="checkbox"/>	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual, infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis
4	<input type="checkbox"/>	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e. tenderness, swelling, or effusion).
4	<input type="checkbox"/>	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/adolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	<input type="checkbox"/>	Urinary Casts	Heme-granular or red blood cell casts
4	<input type="checkbox"/>	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	<input type="checkbox"/>	Proteinuria	>0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	<input type="checkbox"/>	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	<input type="checkbox"/>	New Rash	New onset or recurrence of inflammatory type rash.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	<input type="checkbox"/>	Mucosal Ulcers	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations

2	<input type="checkbox"/>	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	<input type="checkbox"/>	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram confirmation.
2	<input type="checkbox"/>	Low Complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	<input type="checkbox"/>	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	<input type="checkbox"/>	Fever	>38°C. Exclude infectious cause
1	<input type="checkbox"/>	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm ³
1	<input type="checkbox"/>	Leukopenia	<3,000 White blood cell/mm ³ . Exclude drug causes.

_____ TOTAL SCORE (Sum of weights next to descriptors marked present)

Mild or Moderate Flare <input type="checkbox"/>	Severe Flare <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> Change in SLEDAI > 3 points	<input type="checkbox"/> Change in SLEDAI > 12
<input type="checkbox"/> New/worse discoid, photosensitive, profundus, cutaneous vasculitis, bullous lupus Nasopharyngeal ulcers Pleuritis Pericarditis Arthritis Fever (SLE)	<input type="checkbox"/> New/worse CNS-SLE Vasculitis Nephritis Myositis Pk < 60.000 Home anemia: Hb <7% or decrease in Hb > 3% Requiring: double prednisone Prednisone>0.5 mg/kg/day hospitalization
<input type="checkbox"/> Increase in Prednisone, but not to >0.5 mg/kg/day	<input type="checkbox"/> Prednisone >0.5 mg/kg/day
<input type="checkbox"/> Added NSAID or Plaquenil	<input type="checkbox"/> New Cytoxan, Azathioprine, Methotrexate, Hospitalization (SLE)
<input type="checkbox"/> ≥1.0 Increase in PGA, but not to more than 2.5	<input type="checkbox"/> Increase in PGA to > 2.5

Enhanced Phosphoinositide 3-Kinase δ Activity Is a Frequent Event in Systemic Lupus Erythematosus That Confers Resistance to Activation-Induced T Cell Death

Abel Suárez-Fueyo,* Domingo F. Barber,* Jorge Martínez-Ara,[†] Antonio C. Zea-Mendoza,[‡] and Ana C. Carrera*

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a human chronic inflammatory disease caused by the action of autoreactive T and B cells. Class I phosphoinositide-3-kinases (PI3K) are enzymes that trigger formation of 3-poly-phosphoinositides that induce cell survival. Enhanced PI3K activation is a frequent event in human cancer. Nonetheless, in a genetic model with enhanced activation of class I_A PI3K in T cells, mice show a greater tumor index but die of a lupus-like disease. In this study, we studied the potential PI3K involvement in human SLE. The PI3K pathway was frequently activated in SLE patient PBMC and T cells (~70% of cases), more markedly in active disease phases. We examined the mechanism for PI3K pathway activation and found enhanced activation of PI3K δ in SLE peripheral blood T cells. The magnitude of PI3K pathway activation in patients paralleled activated/memory T cell accumulation. We examined potential tolerance mechanisms affected by increased PI3K activity; SLE patients showed reduced activation-induced cell death of activated/memory T cells. Moreover, the defective activation-induced cell death in SLE T cells was corrected after reduction of PI3K δ activity, suggesting that PI3K δ contributes to induction of enhanced SLE memory T cell survival. These observations point to PI3K δ as a target of clinical interest for SLE. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 2376–2385.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disorder initiated by autoreactive T and B cells; it presents a broad range of symptoms, progression stages, and affected organs, depending on the individual case. The genetic defects that underlie SLE are numerous; different combinations are observed in distinct patients and ethnic backgrounds, explaining disease diversity (1–4). Environmental factors such as UV light exposure and previous exposure to Ags affect disease progression, which alternates periods of activity and inactivity (5). Females are most frequently affected (90% of cases); SLE incidence is ~1 in 1000 whites, with higher frequency in blacks, Native Americans, and Asians (1, 2). There is no specific cure for this disease, and current treatments have numerous side effects (6).

A common feature in murine and human SLE is the presence of increased numbers of autoreactive T and B cells and an accumulation of CD4⁺ memory cells (7, 8). Autoreactive T cells support B cell-mediated production of autoantibodies that form immune complexes; autoreactive SLE T and B lymphocytes affect a variety of organs, including skin, brain, and kidney (9). Circulating anti-DNA Abs form complexes that are captured in kidney, the most frequently affected organ, and activate the complement cascade. T cells and macrophages infiltrate affected organs and amplify a local inflammatory response (10). In kidney, at advanced disease phases, the mesangial proliferation, vascular collapse, and immune complex deposition result in renal failure (4, 11). Deregulation of T cell homeostasis is thus a critical event in SLE; distinct T cell defects have been reported in this disease, including altered TCR signaling, reduced IL-2 production, and COX-2 up-regulation (7, 12–16).

Class I phosphoinositide-3-kinases (PI3K) are heterodimeric enzymes comprised of a regulatory and a conserved p110 catalytic subunit that catalyzes formation of phosphoinositide-3,4-diphosphate and phosphoinositide-3,4,5-triphosphate (PIP₃) (17). These lipids recruit proteins containing a pleckstrin homology domain (such as protein kinase B [PKB]) to the cell membrane, promoting cell survival (18). Generalized activation of PI3K in T cells triggers an accumulation of CD4⁺ memory cells and lupus-like disease in mouse, as shown by transgenic expression of an active allele of the p85 regulatory subunit (19), or by heterozygous loss of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN), which negatively controls PIP₃ levels (20).

Class I PI3K are subdivided into p85/p110 heterodimers (p110 α , p110 β , or p110 δ) that are mainly activated by tyrosine kinases (class I_A) and p87- or p101-p110 γ heterodimers that are activated generally by G protein-coupled receptors (class I_B) (18). p110 δ and p110 γ are more abundant in hematopoietic cells, and their deletion affects the immune response (reviewed in Ref. 17). Deletion of p110 δ reduces T cell activation and B cell differentiation,

*Department of Immunology and Oncology, National Center of Biotechnology/Spanish National Research Council, Madrid E-28049, Spain; [†]Department of Nephrology, Hospital La Paz, Madrid 28046, Spain; and [‡]Department of Rheumatology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid 28034, Spain

Received for publication May 31, 2011. Accepted for publication June 29, 2011.

This work was supported by grants from the Spanish Association Against Cancer, the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2007-63624, SAF 2008-00471, and SAF2010-21019), and the Network of Cooperative Research (RD07/0020/2020 and RD08/0075/0015) and by the Carlos III Institute of Health, the Madrid regional government, the Sandra Ibarra Foundation, and Genoma España. A.S.-F. was supported by a predoctoral fellowship from the Carlos III Institute of the Spanish Ministry of Health.

Address correspondence and reprint requests to Prof. Ana C. Carrera, Department of Immunology and Oncology, National Center of Biotechnology/Spanish National Research Council, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain. E-mail address: acarrera@cnb.csic.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AICD, activation-induced cell death; IF, immunofluorescence; NSAID, nonsteroid anti-inflammatory drugs; PHA, phytohemagglutinin A; PI3K, phosphoinositide-3-kinases; PIP₃, phosphoinositide-3, 4,5-triphosphate; PKB, protein kinase B; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index; Treg, regulatory T cells; WB, Western blot.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1101602

whereas p110 γ deletion impairs macrophage and neutrophil migration as well as T cell activation (21, 22). In the mouse, interference with p110 γ ameliorates lupus-like disease by decreasing survival of CD4 $^{+}$ memory cells (23).

In this paper, we studied the contribution of PI3K to human SLE. We detected activation of the PI3K/PKB pathway, which correlated with an increase in the CD4 $^{+}$ memory T cell population in a significant proportion of SLE patients (~70%); this phenotype was more pronounced in patients with active disease. SLE T cells presented an activation-induced cell death (AICD) apoptosis defect; reduction of p110 δ activity corrected their AICD defect. Our results show that p110 δ increased activity is a frequent event in inactive SLE and even more markedly in active SLE, pointing at inhibitors of this enzyme as a promising treatment for this disease.

Materials and Methods

Study subjects

Eighty-eight SLE patients, 20–58 y old and fulfilling at least 4 out of 11 American College of Rheumatology classification criteria for SLE were studied, as well as 45 approximate age- and sex-matched healthy donors (24–55 y old). SLE disease activity index (SLEDAI) scores from patients ranged from 0–44. Patients were classified according to their treatment as follows: untreated, treated with nonsteroid immunosuppressors alone (nonsteroid anti-inflammatory drugs [NSAID]; azathioprine or cyclophosphamide), treated with prednisone alone, with prednisone plus NSAID (azathioprine, cyclophosphamide, tacrolimus, mycophenolate, or hydroxychloroquine), or treated with prednisone, NSAID, and methotrexate. All patients were left untreated for a minimum of 24 h before blood extraction. We examined 12 rheumatoid arthritis patients. The La Paz Hospital Ethics Commission approved the study protocol and obtained informed consent.

Abs, cDNA, and cells

For Western blot (WB), we used rabbit polyclonal anti-phospho-Ser 473 -PKB unless indicated, Thr 308 -PKB, -PKB, -p110 α (C73F8), -p110 β (C33D4; Cell Signaling Technology), goat anti-PTEN, rabbit anti-p110 γ (SC-7177; Santa Cruz Biotechnology), and rabbit anti-p110 δ (ab1678, Abcam) Abs. For immunoprecipitation, we used the same Ab or anti-CD28 (Biosource International), -p110 δ (ab32401; Abcam), -Fc ϵ R1 γ (Upstate), or -ZAP70 (Transduction Laboratories). Conjugated Abs to CD3, CD4, CD8, CD29, CD45RA, CD45RO, CD11b, CD64, CD66b, and CD19 were from BD Biosciences. T cells were activated with anti-CD3 (UCHT-1) and -CD28 (BD Pharmingen) mAb, with anti-CD3 (OKT3; eBioscience) or phytohemagglutinin A (PHA; Invitrogen). PBMC were isolated and T cells purified as described (24). pMT2-KR-p110 δ and pcDNA3.1-KR-p110 γ plasmids were donated by B. Vanhaesebroeck (Institute of Cancer, London, U.K.) and M. Wymann (University of Basel, Basel, Switzerland) and were subcloned in pEF-BOS XC. p110-caax mutants were described (24).

Flow cytometry, WB, and PI3K assays

To identify PBMC subpopulations, we studied samples from 55 SLE patients (21–58 y of age; SLEDAI 0–30) and 31 healthy donors (24–55 y old). Flow cytometry was performed using three-color immunofluorescence (IF) with a Coulter Epics XL-MCL flow cytometer (Coulter) (24). Extraction (in 1% Triton X-100 lysis buffer), WB, and PI3K assays were described (24). We used specific Abs (see above) to immunoprecipitate PI3K isoforms from cell extracts (200 μ g) prepared immediately after blood extraction. Immunopurified PI3K was resuspended in 45 μ l 50 mM HEPES containing phosphoinositide-4,5-diphosphate (0.5 mg/ml; Sigma-Aldrich). The kinase reaction (final volume 50 μ l) was initiated by adding 5 μ l 10 \times kinase buffer (10 μ M [32 P]ATP, 100 mM MgCl $_2$, and 200 μ M cold ATP). Reactions were incubated (25 min, 37°C) and terminated by addition of 1 mM HCl (100 μ l) and methanol/chloroform (1:1 v/v; 200 μ l). Phospholipids were resolved in silica gel 60 plates (Merck) (pretreated with 1% potassium oxalate) with glacial acetic acid/H $_2$ O/*n*-propyl alcohol (4:31:65 v/v/v). Radioactive products were visualized by autoradiography and quantified with ImageJ (National Institutes of Health); specific PI3K activity was calculated by dividing PIP $_3$ signal intensity by enzyme levels determined in total cell extracts (50 μ g) by WB and quantitated with ImageJ (National Institutes of Health).

DNA synthesis, anergy, apoptosis assays, and transfection

Anergy was induced as reported (25). Plates (24-well; Falcon/BD Biosciences) were coated with 1 μ g/ml (0.3 ml/well) goat anti-mouse IgG

(Sigma-Aldrich) in 150 mM Tris-HCl (pH 8.8) (overnight, 4°C). Plates were washed and coated with anti-CD3 (OKT3) as above. Cells (6×10^5 /well) were added in RPMI 1640/10% FCS in triplicate. After 7 d, cells were transferred to uncoated 24-well plates and incubated 24 h, then replated (1×10^5 /well) in 96-well plates precoated with anti-CD3 (UCHT1; 1 μ g/ml) as above. DNA synthesis was examined after 72 h by adding [3 H]thymidine (25 Ci/mM; Amersham Biosciences) for the last 12 h; for Fig. 8, 96-well plates were coated with anti-CD3 and -CD28 (0.15 μ g/well each) (24). For spontaneous and AICD, a set of SLE patients (SLEDAI 0–12; 20–45 y old) and healthy donors (25–55 y old) were analyzed in parallel. T cell lines were established from PBMC by activation with 1% PHA in RPMI 1640/10% FCS (72 h) and subsequent expansion in the presence of IL-2 (30 U/ml). After 13 d, 1.5×10^5 cells were transferred to untreated 96-well culture plates (for spontaneous cell death) or plates precoated with 0.3 μ g/ml anti-CD3 mAb (OKT3) in 0.1 ml/well (for AICD). After 72 h, cells were stained with Annexin/propidium iodide (23). Jurkat cells were electroporated and examined with cDNA at 290 V and 975 μ F, as reported (26).

Indirect IF

PBMC were washed twice with incomplete RPMI and resuspended in 1 mM PBS-EDTA. For IF, we purified CD4 $^{+}$ cells by negative selection; PBMC were stained with PE-conjugated anti-CD8 plus FITC-anti-CD45RO or, alternatively, with PE-anti-CD8 plus FITC-anti-CD45RA. Unlabeled cells were sorted on an Epics Altra (Beckman Coulter), then stained to confirm memory or naive CD4 $^{+}$ T cell purification; the proportion of CD8 $^{+}$ cells was always <1%. Purified cells (5×10^4) were resuspended in RPMI with 10% individual donor serum (10 min) and then plated on poly-L-lysine-coated glass slides using a cytopsin. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS (5 min), washed twice in PBS, permeabilized by incubation with 0.3% Triton X-100 in PBS (5 min), and blocked in 0.01% Triton X-100 in PBS containing 1% BSA/10% goat serum (1 h, room temperature). Cells were incubated (overnight, 4°C) with anti-Ser 473 -p-PKB and -CD3 (UCHT-1) or -CD19 (Santa Cruz Biotechnology), labeled with Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit IgG and Cy3-goat anti-mouse IgG Ab, and stained/mounted with Hoechst 33258 (10 μ g/ml) in 33% glycerol-PBS. Confocal microscopy and double-fluorescence analysis were performed with a FluoView1000 (Olympus) or Zeiss Axiovert LSM 510 (Zeiss) confocal microscope.

Statistics and quantitation

Data are presented as mean \pm SEM. Where mentioned, unpaired two-tailed Student *t* test was included with Welch's correction; the χ^2 test and ANOVA were also used (indicated). Correlation significance was established with Pearson's correlation coefficient. Statistics were performed using GraphPad Prism v5.0 software (GraphPad). Significance was defined as *p* < 0.05. Gel bands and fluorescence intensity were quantitated with ImageJ software (National Institutes of Health). All quantitation was performed using low-exposure film (in the linear range); for quantitation of IF images, all images were acquired in the same conditions.

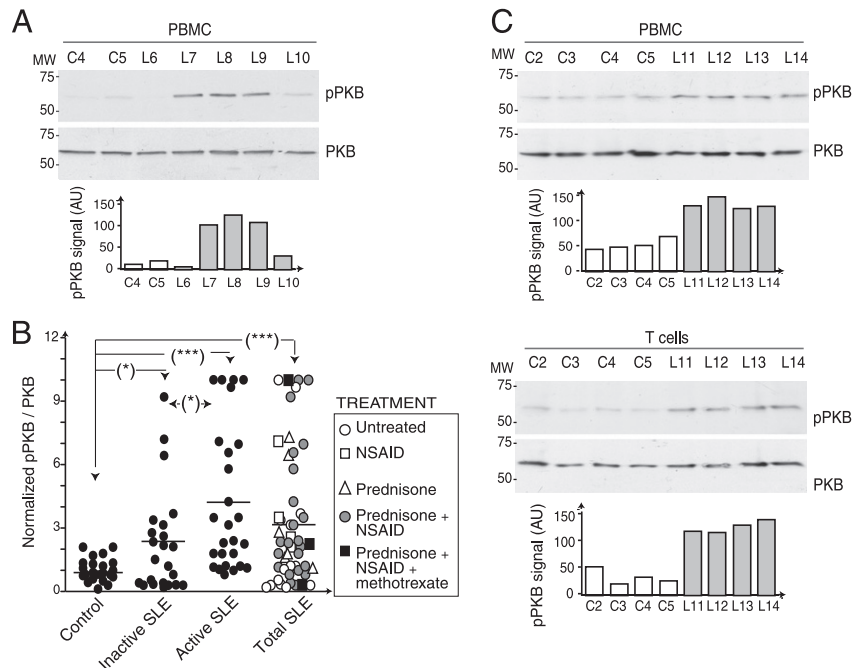
Results

The PI3K/PKB pathway is frequently activated in PBMC from SLE patients

We compared the activation status of the PI3K pathway in approximate age- and sex-matched healthy donors and SLE patients (untreated for at least 24 h prior to blood extraction). We prepared PBMC extracts immediately after purification and determined activation of the PI3K effector PKB by evaluating p-PKB levels in WB (23). Most control individuals had low p-PKB levels; in contrast, ~70% of the SLE patients showed high p-PKB levels (Fig. 1A), within the range of p-PKB levels observed after T cell activation (Supplemental Fig. 1A). We quantitated p-PKB levels and normalized them to PKB. The p-PKB/PKB ratio in SLE patients (*n* = 48) and controls (*n* = 30) indicated that PBMC from SLE patients had higher p-PKB levels than healthy donors (3.7 ± 0.6 versus 1.0 ± 0.1 , respectively; Fig. 1B). High p-PKB/PKB levels were found in untreated patients as well as in those treated with nonsteroid or steroid immunosuppressors or combinations; PI3K pathway activation is thus intrinsic to disease.

SLE is a chronic disease that remains inactive for long periods, separated by phases of high activity; these can be assessed using

FIGURE 1. p-PKB levels are increased in SLE PBMC and T cells. **A**, PKB activation in extracts of PBMC derived from SLE patients (L) and controls (C) was examined in WB using anti-p-PKB and -PKB Abs. Immunoblots for one representative experiment are shown. The graph shows quantitation of the p-PKB signal (in arbitrary units [AU]) normalized to PKB levels (below). Quantitation was performed using low-exposure films (in the linear range). **B**, Scatter diagram showing cumulative data (p-PKB/PKB ratio) from SLE patients ($n = 48$) and normal individuals ($n = 30$). Results for patients with active (SLEDAI ≥ 4) and inactive disease are shown separately. In the total SLE column, patients are classified according to treatment as follows: untreated; treated with NSAID (azathioprine or cyclophosphamide); treated with prednisone alone; with prednisone plus an additional NSAID (azathioprine, cyclophosphamide, tacrolimus, mycophenolate, or hydroxychloroquine); or treated with prednisone, NSAID, and methotrexate. **C**, Immunoblots from a representative experiment ($n = 4$) comparing p-PKB levels in PBMC (upper panel) or purified T cells (lower panel). Graphs as in **A**. Student t test with Welch's correction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



SLEDAI (27, 28). To determine whether there is a relationship between PI3K pathway activation and disease activity, we studied the correlation between increased p-PKB levels and high SLEDAI scores using a cutoff value of 4 for active and inactive cases (29). We analyzed p-PKB/PKB ratios in patients with active (SLEDAI ≥ 4 ; $n = 27$) and inactive SLE ($n = 21$) (Supplemental Table I). Although p-PKB values were higher in SLE patients than controls and higher in active than inactive SLE (3.9 ± 0.6 versus 2.1 ± 0.5 , respectively; $p = 0.03$; Fig. 1B), the SLEDAI did not correlate well with the p-PKB/PKB ratio (not shown). This imperfect correlation might be due to the fact that the SLEDAI score is based on symptoms rather than on molecular defects. Rheumatoid arthritis patients did not show increased p-PKB/PKB ratios (Supplemental Fig. 1B). PI3K/PKB pathway activity is thus elevated in PBMC from SLE but not rheumatoid arthritis patients.

The PI3K/PKB pathway is activated in SLE naive and memory T cells

T lymphocytes are the most abundant cell subpopulation in PBMC (~70%); the increase in PKB activity might reflect PI3K pathway activation in T cells. To examine this, we purified T cells from a larger blood volume in a group of patients. Patients showed parallel results in T lymphocytes and PBMC (Fig. 1C), indicating that the enhanced PI3K/PKB pathway activation in PBMC is due at least in part to pathway activation in T cells.

According to their previous Ag exposure, peripheral T cells are divided into naive T cells, which have not previously encountered Ag, and memory cells, which have been activated and differentiate into long-lasting, more efficient Ag-responsive cells (7, 15). SLE disease is maintained throughout life due to the presence of autoreactive/memory T cells (3, 12, 13). To determine whether the increase in PI3K activity is a consequence of disease (present only in activated/memory cells) or an intrinsic defect in naive T cells prior to autoantigen stimulation, we examined pathway activation in both cell subsets.

We compared p-PKB IF staining in CD4⁺CD45RA⁺ or CD45RO⁺ cells, the former (CD45RA⁺) expressed in naive T cells and the latter in memory T cells (30). p-PKB levels were increased both in naive and memory T cells from SLE patients (Fig. 2).

Whereas a certain level of p-PKB was found in the nucleus in control and SLE T cells, SLE naive T cells, but not control naive T cells, showed a positive p-PKB signal at the cell membrane (Fig. 2). In addition, memory cells had higher p-PKB levels than naive cells in both healthy individuals and SLE patients, but SLE memory cells presented significantly higher p-PKB levels than memory cells from controls (Fig. 2). Activation of PI3K/PKB reduces the T cell activation threshold (19); the presence of active-PKB in naive T cells from SLE patients might contribute to facilitate activation by autoantigens and disease development.

The low proportion of B cells (7–10%) in the small blood sample available from patients did not permit WB analysis; we thus examined PI3K/PKB pathway activation by IF. B cells were simultaneously stained with an anti-CD19 mAb and an anti-p-PKB Ab. SLE B cells had higher p-PKB levels at the cell membrane than control B cells (Supplemental Fig. 1C). Quantitation of p-PKB signal intensity (in the same image collection conditions) nonetheless showed that naive and memory T cells have a higher p-PKB signal intensity than B cells (Fig. 2, Supplemental Fig. 1C).

The memory T cell population is increased in SLE

Expression of an activated PI3K allele as a transgene in murine T cells increases the proportion of CD4⁺ memory cells and induces development of a lupus-like disease (19). To test for a potential relationship between PI3K and memory cell expansion in the human disease, we compared PBMC populations in healthy donors and SLE patients.

SLE patients showed a moderately increased proportion of B cells (~3%) and a modest decrease in T cells (Supplemental Fig. 2A). Within T cells, SLE samples showed an increase in the proportion of CD8⁺ and a decrease in the proportion of CD4⁺ T cells compared with controls (Supplemental Fig. 2A). The reduction in the proportion of CD4⁺ T cells is probably due to the presence of anti-CD4 lymphocyte Abs in human SLE patients (31); neutrophils and macrophages were increased in ~20% of the patients (10).

To evaluate memory cell populations, we examined CD45RA⁺ and CD45RO⁺ cells (30). Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets had

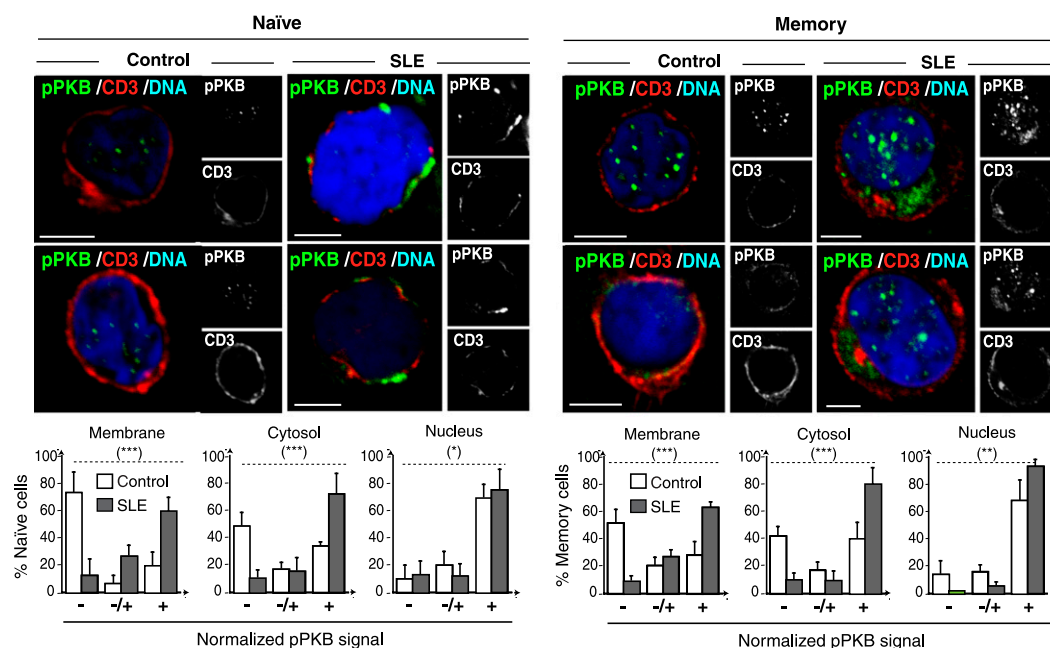


FIGURE 2. p-PKB levels are increased in SLE naive and memory T cells. Sorted CD4⁺CD45RO⁺ or CD4⁺CD45RA⁺ T cells from eight active SLE patients or healthy controls were stained with Hoechst 33258, anti-CD3, and -p-PKB Ab (representative images). p-PKB signal intensity was quantitated and scored as 0 (below background, $\sim 10^3$ pixels), -/+ (from 10^4 – 4.5×10^4 pixels), and + ($\geq 4.5 \times 10^4$ pixels). Graphs show the percentage of cells with p-PKB staining in membrane, cytosol, or nucleus (mean \pm SEM; $n = 25$ cells/patient). Scale bars, 5 μ M. χ^2 test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

a higher proportion of memory cells (and a reduced proportion of naive cells) in SLE patients compared with healthy donors (Fig. 3). We also examined cells expressing CD29, a receptor expressed in activated/memory cells (32). The higher proportion of CD4⁺CD29⁺ and CD8⁺CD29⁺ cells in SLE patients confirmed memory cell enrichment in SLE patients, which was more marked in active SLE (Fig. 3). The increase in memory cell proportion did not correlate with any specific patient treatment and was therefore intrinsic to disease (Fig. 3). Examination of absolute numbers of CD8⁺ memory cells (Supplemental Fig. 2B) confirmed CD8⁺ memory cell accumulation in SLE patients; nonetheless, within CD4⁺ cells, we observed a less marked increase in memory cell numbers than in their proportion in SLE (Fig. 3, Supplemental Fig. 2B). This is probably caused by the presence of anti-CD4-lymphocyte autoantibody, particularly in active disease phases, which reduces CD4⁺ cell numbers in SLE patients (31). We used memory/naive cell proportions to compare all patients, which showed enhanced naive to memory cell differentiation in SLE, independently of the presence of anti-CD4-lymphocyte Ab.

The memory/naive cell ratio must be maintained for T cell homeostasis; an increase in memory/naive ratio is an indication of disease onset (19, 33). The memory/naive cell ratio in controls was ~ 1 for CD4⁺ and ~ 0.3 for CD8⁺ cells (33). In agreement with the high proportion of memory cells found in SLE, memory/naive ratios were higher in SLE CD8⁺ and CD4⁺ cells and markedly higher in active SLE CD4⁺ cells (Fig. 4A).

Altered CD4⁺ memory/naive ratio correlates with high p-PKB levels in active SLE

We examined whether PI3K/PKB pathway activation in SLE correlated with an accumulation of memory cells. No correlation was found between p-PKB levels and CD8⁺ memory cells (20–40% of total memory cells). Nonetheless, although absolute CD4⁺ memory cell numbers vary among patients due to the presence of anti-CD4 autoantibody (31), CD4⁺ memory cell numbers tended to increase in parallel with p-PKB levels in active SLE (Supplemental Fig. 2C). Moreover, p-PKB levels correlated well with the

CD4⁺ memory/naive ratio in active SLE (Fig. 4B). p-PKB levels thus increased in parallel with the proportion of memory cells as SLE progressed; in active SLE, high p-PKB levels correlated with high CD4⁺ memory/naive ratios.

p110 δ is frequently activated in SLE

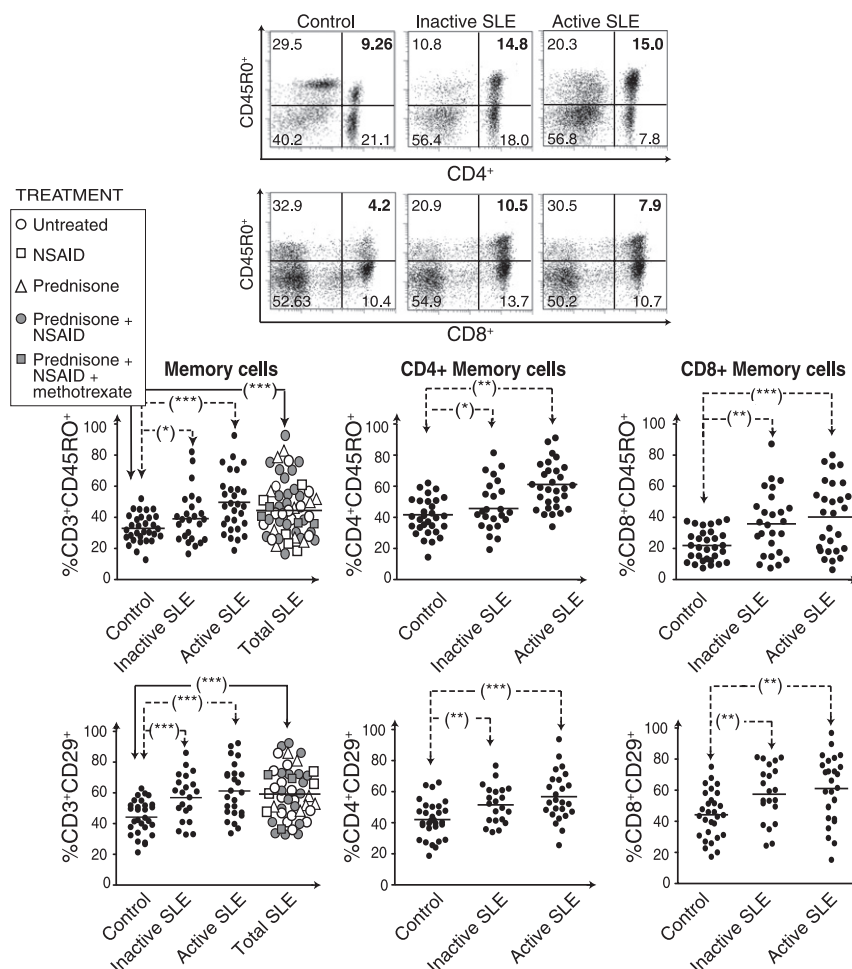
PI3K/PKB pathway induction can be achieved either by enhanced activation of a PI3K isoform or by deletion of the PIP₃-phosphatase PTEN. We analyzed whether enhanced PI3K/PKB pathway activation in SLE patients correlated with reduced PTEN levels, but found no differences in PTEN levels compared with controls (Supplemental Fig. 3A). To establish whether activation of a p110 isoform might be responsible for p-PKB enhancement in human SLE, we compared the activity of the two most abundant hematopoietic PI3K isoforms, p110 γ and p110 δ , in healthy controls and SLE patients.

PI3K isoforms were immunopurified from cell extracts prepared immediately after blood extraction. We determined enzyme expression levels in total extracts by WB and measured PIP₃ production using in vitro kinase assays; specific PI3K activities were calculated considering PIP₃ production and enzyme levels. Each assay was controlled by parallel examination of p110 γ and p110 δ activation after normal PBMC stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 mAb.

Specific p110 γ activity was similar in controls and patients; in contrast, specific p110 δ activity was increased in SLE and more markedly in active SLE (Fig. 5). Quantitation of p110 γ and p110 δ levels and activity in a larger patient cohort showed that differences in p110 γ activity were not significant, whereas more than half of the SLE patients showed increased p110 δ activity, which was more marked in active SLE cases (Fig. 6A). We found that p110 δ activation was independent of patient treatment (not shown).

PI3K associates to transmembrane receptors following stimulation (17). To confirm that p110 δ activity was increased in active SLE T lymphocytes, we sought a T lymphocyte receptor that preferentially bound p110 δ . Control cells were activated with the pan-T cell mitogen PHA, which binds to all glycosylated receptors, and

FIGURE 3. Increased memory cell population in SLE patients. Representative dot plot of a control subject and patients with inactive and active SLE. The percentage of CD45RO⁺ cells in CD4⁺ and CD8⁺ subsets is shown in bold. Cumulative data of the proportion of CD45RO⁺ or CD29⁺ cells in CD3⁺, CD8⁺, and CD4⁺ cell subsets from SLE patients ($n = 55$) and controls ($n = 31$) are shown. Statistics and treatments are as in Fig. 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



tested p110 association with receptors such as Fc ϵ RI γ -chain, CD3, and CD28 or to the T cell intracellular kinase ZAP70 (16, 34).

Fc ϵ RI γ -chain associated the greatest amount of p110 δ (Fig. 6B). Fc ϵ RI γ -chain expression is increased in SLE (35) and could contribute to p110 δ activation in patients. Because control T cells had very low Fc ϵ RI γ -chain levels, however, we could not use this receptor to compare p110 δ activation in SLE patients and control individuals. ZAP70 also associated to p110 δ even before cell stimulation and to a greater extent than p110 γ (Fig. 6B). ZAP70-associated PI3K activity was also increased in approximately two thirds of SLE samples and was more marked in active SLE (Fig. 6C), confirming that p110 δ activation contributes to PI3K/PKB activation in SLE (Fig. 6C).

Anergy is similar in control and in SLE T cells

Several mechanisms safeguard mammals from T cell-mediated autoimmunity. Thymic negative selection induces deletion of de-

veloping autoreactive T cells (central tolerance). This process is complemented by peripheral tolerance mechanisms that include the action of regulatory T cells (Treg), induction of anergy (when antigenic stimulation is incomplete), and induction of apoptosis (25, 36–38). In the case of apoptosis, two processes contribute to downregulation of the immune response: spontaneous apoptosis, which occurs when cytokine levels decrease at the end of an immune response (26), and AICD, which occurs when already activated T cells are restimulated with Ag (such as a self-antigen) (38).

Central tolerance shows no defects in murine lupus models (39); the contribution of Treg in SLE is debated (3, 37). We examined anergy by stimulating control and SLE-derived T cells with anti-CD3 (without anti-CD28 Ab) (34). In these conditions, secondary stimulation results in defective proliferation of T cells, which is corrected by IL-2 addition (25); we found no differences in anergy induction between control and SLE patient T cells (Fig. 7A).

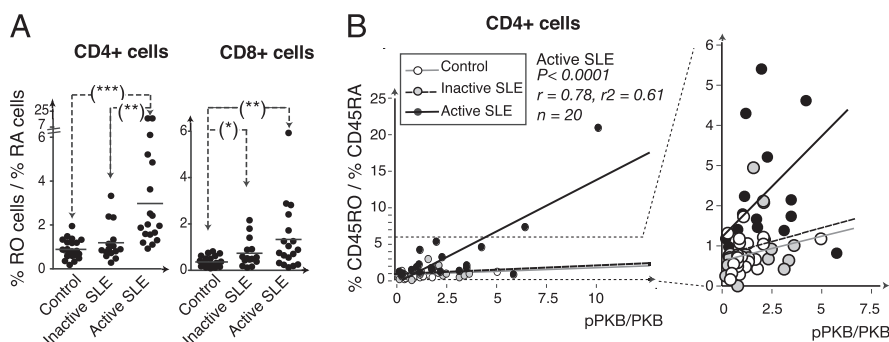


FIGURE 4. Altered memory/naive cell proportions in SLE patients. A, CD45RO⁺/CD45RA⁺ ratio in CD4⁺ and CD8⁺ cells in SLE patients and controls. The p values were calculated as in Fig. 1. B, CD45RO⁺/CD45RA⁺ ratio in CD4⁺ cells relative to normalized p-PKB levels (36 SLE patients and 21 controls). Inset shows y-axis enlargement of the indicated area. Correlation was calculated with Pearson's coefficient. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

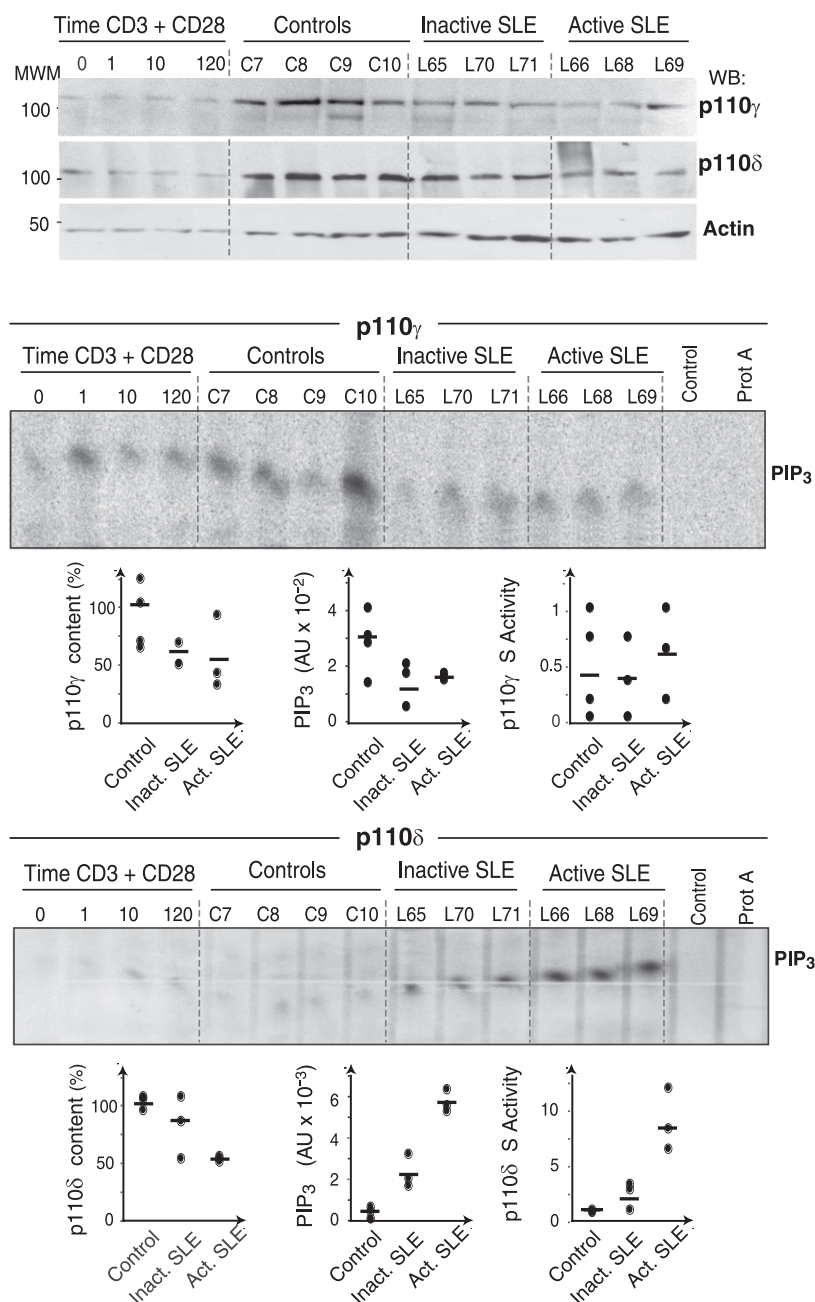


FIGURE 5. PI3K activity in SLE patients. PBMC were obtained from four control individuals (C), three inactive (SLEDAI <4), and three active SLE patients (L). Samples were processed immediately after PBMC purification. Cell extracts (50 μ g) were tested in WB or immunoprecipitated (200 μ g) with anti-p110 γ or -p110 δ Ab and tested in an in vitro PI3K assay. As a positive control, an additional control sample was incubated in serum-free medium (90 min) and stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 Ab for the times indicated (min). Graphs show the PIP₃ signal (arbitrary units [AU]) from PI3K assays, the p110 γ or p110 δ levels (the WB signal in AU) normalized to actin and compared with the mean control value (100%), and PI3K sp. act. (the ratio of the PIP₃ signal and the normalized p110 γ or p110 δ WB signal).

AICD defect in SLE

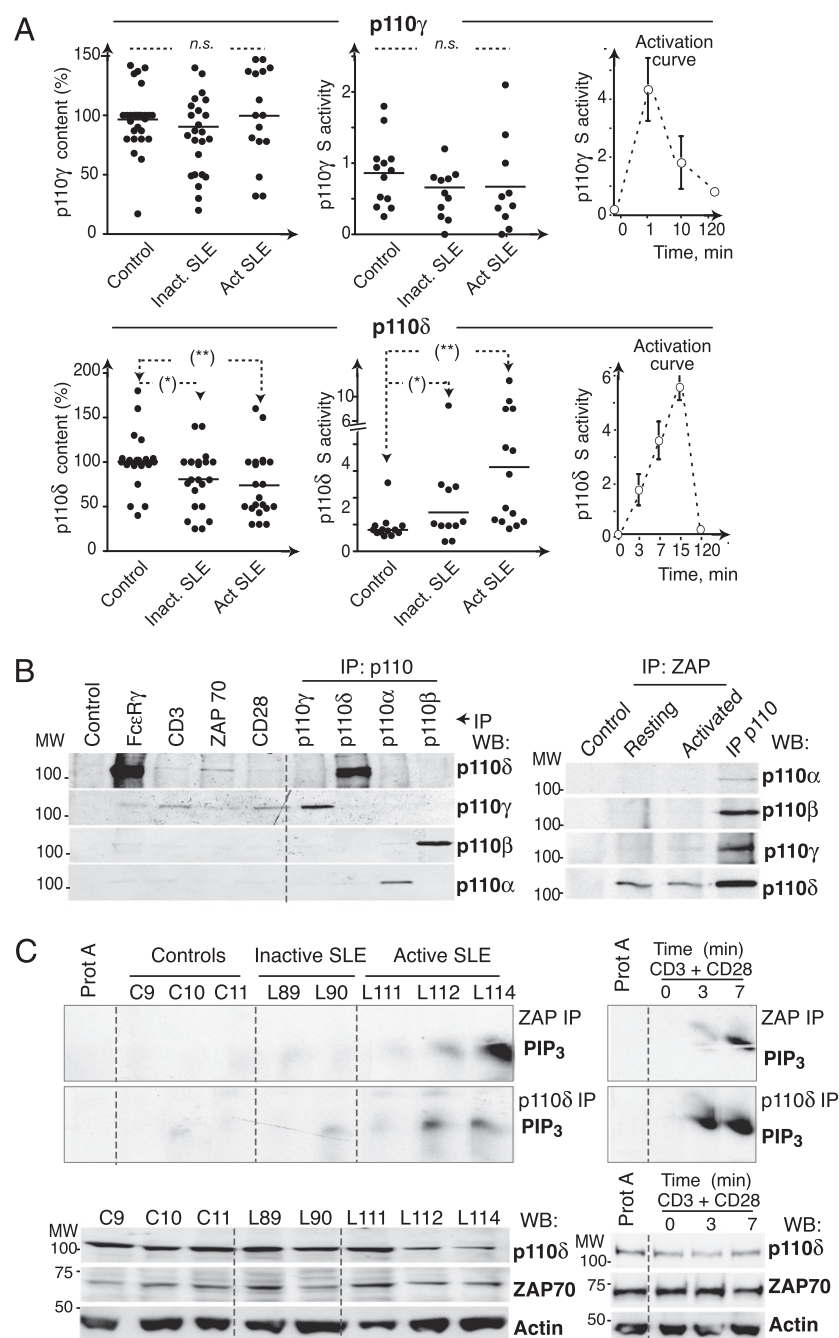
Considering that PI3K activation is a major pathway in induction of cell survival (17), we next examined apoptosis. We analyzed spontaneous death and AICD following previously reported protocols (38, 40). We stimulated purified lymphocytes in a primary immune response and cultured them with IL-2 for 13 d. Cells were then deprived of IL-2 (spontaneous death) or restimulated with anti-CD3 (AICD). We detected no significant difference in the proportion of spontaneous apoptosis in T cells from SLE patients and controls (Fig. 7B). To evaluate apoptosis of activated cells, we calculated the ratio between the proportion of activated cells that underwent apoptosis after subsequent activation (AICD) and after growth factor deprivation (spontaneous apoptosis); a value of 1 indicates that no notable AICD is induced. SLE patients showed a pronounced AICD defect, more marked in active SLE (Fig. 7C). Defects in AICD were found in treated and untreated patients (not shown). Because AICD takes place in previously activated cells, defective AICD is a mechanism for memory cell accumulation in SLE.

AICD defect is induced by increased PI3K pathway activation

Activation of PI3K is sufficient to increase cell survival (19); defective apoptosis in SLE T cells could thus be caused by enhanced p110 δ activity. To test whether alterations in PI3K activation lead to AICD resistance, we tested the consequences on this process of expressing inactive p110 δ or p110 γ mutants (KR-p110 δ , KR-p110 γ) (21, 24).

We examined AICD in a human T cell leukemia cell line (Jurkat) that lacks PTEN expression and shows generalized activation of the PI3K pathway (41). Jurkat cells were electroporated with cDNA encoding control vector, KR-p110 δ or KR-p110 γ (24 or 48 h), or with a constitutive active p110 δ -caax mutant (Fig. 7D, 7E). Active p110 δ expression moderately increased p-PKB and reduced AICD, whereas inactive p110 δ or p110 γ reduced p-PKB levels and increased AICD in Jurkat cells (Fig. 7D, 7E). We confirmed these results using selective PI3K inhibitors: AS252424 for p110 δ , IC87144, and Ly294002 as a pan-p110 inhibitor (42, 43). AS252424 and IC87144 selectively inhibited

FIGURE 6. Increased PI3K δ activity is observed in active SLE. **A**, Cumulative data for quantitated p110 γ or p110 δ levels and sp. act. in PBMC from controls and patients with inactive and active SLE, as in Fig. 5. Graphs (*right panels*) show the mean of activity curves from stimulated controls as in Fig. 5 ($n = 6$). **B**, Representative WB of p110 γ and p110 δ coimmunoprecipitation with various anti-receptor or -ZAP70 Abs from extracts of PHA-activated PBMC (5 min). *Right panel* shows ZAP70 immunoprecipitation and WB for PI3K isoforms. **C**, PI3K assays in immunoprecipitates of ZAP70 and p110 δ . WB shows protein levels in cell extracts (*bottom panel*). The p values were calculated as in Fig. 1.



p110 γ and p110 δ , respectively (Supplemental Fig. 3B). Inhibition of p110 γ or p110 δ reduced p-PKB levels and increased AICD in Jurkat cells (Fig. 7E), confirming that PI3K pathway activation modulates AICD. The recovery of AICD by both p110 δ and p110 γ inhibitors (or KR-mutants) is explained by the lack of PTEN in Jurkat cells that enhances the action of all PI3K isoforms.

Inhibition of p110 δ rescues the AICD defect in SLE

Based on these observations, we hypothesized that defective apoptosis in SLE T cells might be caused by enhanced p110 δ activity. To test this possibility, we selectively inhibited p110 δ or p110 γ prior to AICD induction in activated T cells from controls and SLE patients. p110 δ and p110 γ inhibitors have an effect similar to that of gene mutation in the mouse (44–46), but permit selective inhibition of each isoform at the time of AICD induction. General PI3K inhibition using Ly294002 increased AICD in controls and

SLE (Fig. 8A, gray circles); inhibition of a single isoform with selective inhibitors did not significantly affect AICD in controls (Fig. 8A). In contrast, in SLE T cells, inhibition of p110 δ but not of p110 γ restored AICD (Fig. 8A). Selective inhibition of p110 δ therefore corrected the AICD defect of active and inactive SLE patients. Involvement of p110 δ activity in AICD regulation in SLE patients does not exclude the implication of additional PI3K isoforms in AICD control in human T cells, as generalized PI3K inhibition (with Ly294002) increased AICD in controls and patients. The selective action of p110 δ inhibitors in AICD in SLE T cells is in agreement with the selective enhanced activation of this isoform in SLE.

A potential undesired effect of blocking PI3K isoforms is a reduction in primary T cell activation. We measured anti-CD3 plus anti-CD28-induced T cell activation in normal control cells in the presence of p110 inhibitors. At the highest doses (5–

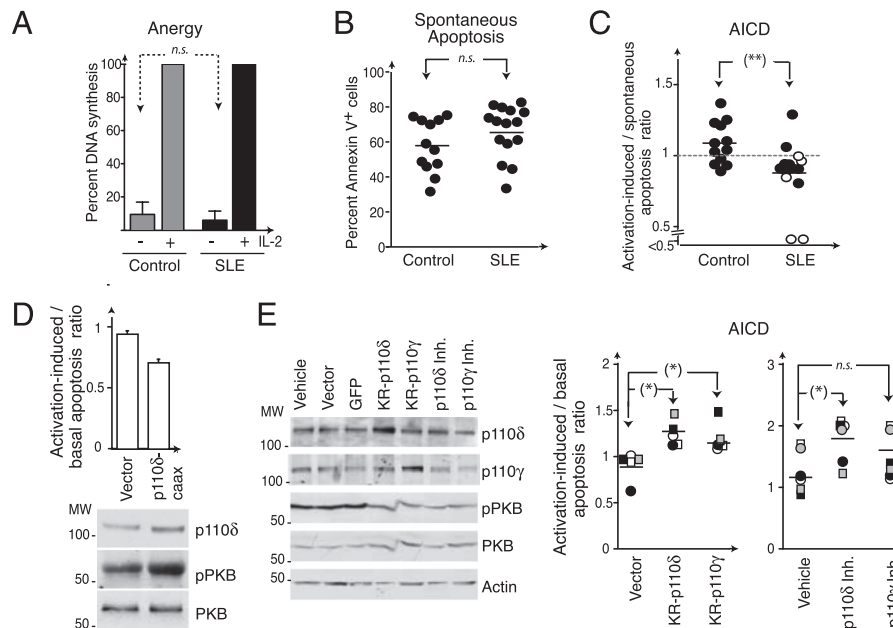


FIGURE 7. Defective AICD in SLE T cells. *A*, Anergy was induced by PBMC stimulation with plate-bound anti-CD3 Ab; after 7 d, cells were restimulated with anti-CD3, and [3 H]thymidine incorporation was measured. The diagram shows relative mean \pm SEM for five SLE patients and five healthy donors. IL-2 plus CD3 was considered in each case as 100%. *B*, Percentage of Annexin V $^+$ T cells in spontaneous apoptosis conditions for controls ($n = 12$) and SLE patients ($n = 15$). *C*, Diagram shows cumulative AICD results from controls ($n = 12$) and SLE patients ($n = 15$). Results are expressed as a ratio of specific/spontaneous apoptosis. Open circles correspond to patients with active SLE. *D* and *E*, Jurkat T cells were transfected by electroporation with p110 δ -caax, KR-p110 δ , or KR-p110 γ (24 h) or treated with AS252424 (5 μ M) or IC87144 (10 μ M) (6 h). p-PKB/PKB levels were examined in WB. AICD was analyzed in Jurkat cells as in *C*; spontaneous apoptosis was that induced by electroporation or vehicle. In *B*, *C*, and *E* (right panel), each symbol represents one assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

10 μ M), both AS252424 and IC87144 reduced T cell activation (Fig. 8*B*), as reported (21, 45); nonetheless, in the 0.5 μ M range, the p110 δ -specific inhibitor restored AICD in SLE T cells (Fig. 8*A*), but did not greatly affect normal T cell division (Fig. 8*B*). Partial p110 δ inhibition thus restored AICD in SLE without markedly disrupting Ag-induced primary activation of normal T cells.

Discussion

PI3K is a major participant in the induction of cell survival; mutations in this pathway are frequent in human cancer. In the mouse, however, PI3K activation in vivo not only increases cancer susceptibility, but also reduces lifespan by triggering a lupus-like

disease (19, 20). We examined the potential involvement of the PI3K pathway activation in human SLE and show that $\sim 70\%$ of SLE patients exhibit enhanced PI3K/PKB pathway activation in PBMC and T cells. This increased PI3K pathway activation in SLE appears to be caused by enhanced activity of the hematopoietic p110 δ isoform. SLE patients also showed a frequent defect in AICD that was corrected by inhibition of p110 δ . Activation of the PI3K/PKB pathway correlated with an increase in the proportion of CD4 $^+$ memory cells, a hallmark of murine and human SLE (7, 8). These results point at enhanced p110 δ activity as a cause for the accumulation of long-lasting memory cells in SLE patients, because p110 δ inhibition corrected the apoptosis defects of activated/memory SLE T cells.

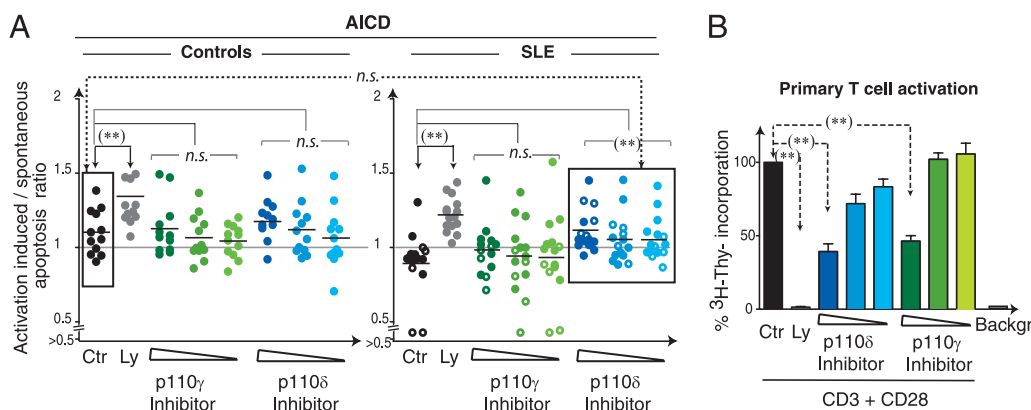


FIGURE 8. Inhibition of PI3K δ , but not of PI3K γ , restores AICD in SLE T cells. *A*, Cumulative AICD results from untreated T cells from controls ($n = 12$) and SLE patients ($n = 15$) (as in Fig. 7*C*) compared with cells treated with AS252424 (5, 1, and 0.5 μ M, greens) for p110 γ , IC87144 (10, 1, and 0.5 μ M, blues) for p110 δ , or Ly294002 (10 μ M, light gray) as a pan-p110 inhibitor; vehicle (DMSO) was used as control. Results are expressed as a ratio of specific/spontaneous apoptosis. Open circles correspond to patients with active SLE. *B*, DNA synthesis in T cells stimulated with anti-CD3 + anti-CD28 Ab (72 h) in healthy donors ($n = 6$). The p values were calculated using ANOVA (*A*) or as in Fig. 1 (*B*). ** $p < 0.01$.

We examined the mechanism of PI3K/PKB pathway activation by analyzing the kinase activity of the hematopoietic PI3K isoforms (p110 δ and p110 γ) and the expression levels of the negative pathway regulator PTEN phosphatase. PTEN levels were unaltered (0 out of 13 SLE cases examined), but p110 δ kinase activity was frequently enhanced in SLE, suggesting that enhanced p110 δ activity is a mechanism underlying the increased PI3K/PKB activity in this disease. Activation of p110 δ , AICD defects, and CD4⁺ memory cell accumulation were found in inactive and active SLE patients, although all these phenotypes and the memory/naive ratio increase were significantly higher in active SLE.

To determine whether PI3K/PKB pathway activation was found selectively in the cell population responsible for disease maintenance (long-lasting autoreactive/memory cells) or was also found in virgin T cells, we examined activation of this pathway in both populations by IF of the PI3K effector PKB. The presence of activated PKB in naive cells suggests that although p-PKB levels are higher in active phases (when autoreactive cells are reactivated), pathway activation is intrinsic to disease susceptibility, as it is found in cells that have not encountered Ag. Because PI3K activation enhances survival and reduces the activation threshold for T cells (18–20), PI3K/PKB activation in naive cells might facilitate their activation by autoantigens and, in turn, disease generation. As mentioned above, p110 δ activity levels were even greater in patients with active SLE. One of the defects defined in human SLE T cells is the frequent replacement of the CD3 receptor ζ -chain with the Fc ϵ RI γ -chain (35), which associates p110 δ (Fig. 6). In active SLE phases, PI3K activation might be increased due to reactivation of the TCR and associated Fc ϵ RI γ in autoreactive cells.

We found no direct correlation of SLEDAI and PI3K/PKB activation. This lack of correlation could be due to the fact that the SLEDAI score is symptom-based rather than on molecular defects. SLE patients, particularly those with active disease, nonetheless had higher p-PKB values than controls. Comparison of p-PKB levels with memory cell accumulation showed that CD4⁺ memory cell number increased in parallel with p-PKB levels in SLE. Correlation was better when we compared p-PKB levels and CD4⁺ memory/naive T cell ratio in active SLE, as the memory cell proportion was a better indicator of the actual naive to memory cell differentiation in SLE, independent of the potential presence of anti-CD4 autoantibody (31). p-PKB levels thus increased in parallel to the proportion of CD4⁺ memory cells in active SLE.

Several T cell tolerance defects have been described in SLE. We concentrated on apoptosis, as a large percentage of patients showed reduced apoptosis (AICD), and PI3K activation triggers cell survival (18). Other defects have been reported: Treg involvement in SLE (3, 37), anergy defects (47, 48), and the contribution of Th-17 cells (49). Despite potential involvement of additional tolerance mechanisms in SLE, our findings show that AICD is defective in this disease and corrected by p110 δ inhibition.

This study indicates the need to examine human samples in addition to mouse models. Although PI3K activation correlates with increased CD4⁺ memory cell population in both species, murine lupus development depends on p110 γ activity (19, 23), whereas in man, PI3K/PKB pathway activation correlated with increased p110 δ activation. Our findings suggest the potential clinical use of p110 δ inhibitory compounds in SLE. The correction of AICD in SLE T cells by p110 δ inhibition indicates that this treatment might reduce autoreactive/memory cells in these patients. Clinical application is facilitated by the availability of p110 δ inhibitors, currently in clinical trials for chronic myeloid leukemia (44). Soond et al. (45) recently showed that p110 δ inhibition reduces naive and memory T cell activation at high doses;

however, we show that partial p110 δ inhibition normalized AICD in SLE T cells, whereas it only moderately reduced primary activation of healthy donor T cells (Fig. 8). p110 δ inhibition might also be beneficial in mitigating SLE symptoms by reducing B cell survival (44), and it reduces IgE-to-IgG class switch (46). PI3K activation regulates COX-2 levels (47), which are frequently increased in SLE (48); PI3K inhibition could also ameliorate SLE by reducing COX-2 levels.

A large percentage of SLE patients (~70%) showed enhanced PI3K/PKB activation; activity was higher in active phases and correlated with an increased proportion of CD4⁺ memory T cells. The mechanism for the enhanced PI3K/PKB pathway activation in SLE was an increase in p110 δ activity, which was found in patients with inactive and active disease. We propose that increased p110 δ activity promotes enhanced survival of memory cells, contributing to their long-term survival and accumulation in SLE. AICD, which affects only cells previously exposed to Ag, was defective in SLE T cells and was corrected by p110 δ inhibition; this treatment might thus reduce long-term survival of the pathogenic/memory cell population in all patients. In addition, as disease reactivation produces higher p110 δ activity peaks, p110 δ inhibition might also be a treatment for active phases.

Acknowledgments

We thank M. Revuelta-Martínez for help with sample collection, Dr. Kamal D. Puri and Calistoga Pharmaceuticals for advice and donation of p110 δ inhibitor, and C. Mark for editorial assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Graham, R. R., S. V. Kozyrev, E. C. Baechler, M. V. Reddy, R. M. Plenge, J. W. Bauer, W. A. Ortmann, T. Koeuth, M. F. González-Escribano, B. Pons-Estel, et al; Argentine and Spanish Collaborative Groups. 2006. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 38: 550–555.
- Borchers, A. T., S. M. Naguwa, Y. Shoenfeld, and M. E. Gershwin. 2010. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 9: A277–A287.
- Crispín, J. C., S. N. Liossis, K. Kis-Toth, L. A. Lieberman, V. C. Kyttaris, Y. T. Juang, and C. G. Tsokos. 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* 16: 47–57.
- Wakeland, E. K., A. E. Wandstrat, K. Liu, and L. Morel. 1999. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 701–707.
- Golan, T. D., K. B. Elkon, A. E. Gharavi, and J. G. Krueger. 1992. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J. Clin. Invest.* 90: 1067–1076.
- Wentworth, J., and C. Davies. 2009. Systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 103–104.
- Vratsanos, G. S., S. Jung, Y. M. Park, and J. Craft. 2001. CD4(+) T cells from lupus-prone mice are hyperresponsive to T cell receptor engagement with low and high affinity peptide antigens: a model to explain spontaneous T cell activation in lupus. *J. Exp. Med.* 193: 329–337.
- Han, B.K., A.M. White, K.H. Dao, D.R. Karp, E.K. Wakeland, and L.S. Davis. 2005. Increased prevalence of activated CD70/CD4+ T cells in the periphery of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14: 598–606.
- D'Cruz, D. P., M. A. Khamashta, and G. R. V. Hughes. 2007. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369: 587–596.
- Kuroiwa, T., and E. G. Lee. 1998. Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. *Lupus* 7: 597–603.
- Klimman, D. M., and A. D. Steinberg. 1995. Inquiry into murine and human lupus. *Immunol. Rev.* 144: 157–193.
- Hoffman, R. W. 2004. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 113: 4–13.
- Lang, T. J., P. Nguyen, J. C. Papadimitriou, and C. S. Via. 2003. Increased severity of murine lupus in female mice is due to enhanced expansion of pathogenic T cells. *J. Immunol.* 171: 5795–5801.
- Shlomchik, M. J., J. E. Craft, and M. J. Mamulam. 2001. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 147–153.

15. Kong, P. L., J. M. Odegard, F. Bouzazh, J. Y. Choi, L. D. Eardley, C. E. Zielinski, and J. E. Craft. 2003. Intrinsic T cell defects in systemic autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987: 60–67.
16. Krishnan, S., V. G. Warke, M. P. Nambiar, G. C. Tsokos, and D. L. Farber. 2003. The FcR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells. *J. Immunol.* 170: 4189–4195.
17. Fruman, D. A., and G. Bismuth. 2009. Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol. Rev.* 228: 253–272.
18. García, Z., A. Kumar, M. Marqués, I. Cortés, and A. C. Carrera. 2006. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J.* 25: 655–661.
19. Borlado, L. R., C. Redondo, B. Alvarez, C. Jimenez, L. M. Criado, J. Flores, M. A. Marcos, C. Martínez-A, D. Balomenos, and A. C. Carrera. 2000. Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation. *FASEB J.* 14: 895–903.
20. Di Cristofano, A., P. Kotsi, Y. F. Peng, C. Cordon-Cardo, K. B. Elkon, and P. P. Pandolfi. 1999. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/−} mice. *Science* 285: 2122–2125.
21. Okkenhaug, K., A. Bilancio, G. Farjot, H. Priddle, S. Sancho, E. Peskett, W. Pearce, S. E. Meek, A. Salpekar, M. D. Waterfield, et al. 2002. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110δ PI3K mutant mice. *Science* 297: 1031–1034.
22. Hirsch, E., V. L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirolo, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, and M. P. Wymann. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287: 1049–1053.
23. Barber, D. F., A. Bartolomé, C. Hernandez, J. M. Flores, C. Redondo, C. Fernandez-Arias, M. Camps, T. Rückle, M. K. Schwarz, S. Rodríguez, et al. 2005. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat. Med.* 11: 933–935.
24. Alcázar, I., M. Marqués, A. Kumar, E. Hirsch, M. Wymann, A. C. Carrera, and D. F. Barber. 2007. Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in TCR-induced T cell activation. *J. Exp. Med.* 204: 2977–2987.
25. Wolf, H., Y. Müller, S. Salmen, W. Wilmanns, and G. Jung. 1994. Induction of anergy in resting human T lymphocytes by immobilized anti-CD3 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 24: 1410–1417.
26. González-García, A., I. Mérida, C. Martínez-A, and A. C. Carrera. 1997. Intermediate affinity IL-2 receptor mediates survival via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 10220–10226.
27. Ward, M. M., A. S. Marx, and N. N. Barry. 2000. Comparison of the validity and sensitivity to change of 5 activity indices in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 27: 664–670.
28. ACR and HOC Committee on SLE response criteria. 2004. The American College of Rheumatology Response Criteria for SLE Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 50: 3418–3426.
29. Mathian, A., C. Parizot, K. Dorcham, M. Miyara, J. Haroche, P. Debre, and J. C. Piette. 2009. Serum Interferon Alpha Correlates with Disease Activity, Specific Clinical Manifestations and Circulating Plasma Cells Levels in SLE. *Arthritis Rheum.* 60(Suppl 10): 1754.
30. Lefrançois, L., and A. L. Marzo. 2006. The descent of memory T-cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 618–623.
31. Tanaka, S., T. Matsuyama, A. D. Steinberg, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1989. Antilymphocyte antibodies against CD4+2H4+ cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 32: 398–405.
32. Shimizu, Y., G. A. Van Seventer, K. J. Horgan, and S. Shaw. 1990. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature* 345: 250–253.
33. Tan, J., T. Town, L. Abdullah, Y. Wu, A. Placzek, B. Small, J. Kroeger, F. Crawford, D. Richards and M. Mullan. 2002. CD45 isoform alteration in CD4+ T cells as a potential diagnostic marker of Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 132: 164–172.
34. Alcázar, I., I. Cortés, A. Zaballós, C. Hernandez, D. A. Fruman, D. F. Barber, and A. C. Carrera. 2009. p85beta phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* 113: 3198–3208.
35. Enyedy, E. J., M. P. Nambiar, S. N. Liou, G. Dennis, G. M. Kammer, and G. C. Tsokos. 2001. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44: 1114–1121.
36. Fathman, C. G., and N. B. Lineberry. 2007. Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 599–609.
37. Gerli, R., G. Nocentini, A. Alunno, E. B. Bocci, R. Bianchini, O. Bistoni, and C. Riccardi. 2009. Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 8: 426–430.
38. Krammer, P. H., R. Arnold, and I. N. Lavrik. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 532–542.
39. Fatenejad, S., S. L. Peng, O. Disorbo, and J. J. Craft. 1998. Central T cell tolerance in lupus-prone mice: influence of autoimmune background and the lpr mutation. *J. Immunol.* 161: 6427–6432.
40. Kovacs, B., D. Vassilopoulos, S. A. Vogelgesang, and G. C. Tsokos. 1996. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81: 293–302.
41. Shan, X., M. J. Czar, S. C. Bunnell, P. Liu, Y. Liu, P. L. Schwartzberg, and R. L. Wange. 2000. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6945–6957.
42. Pomel, V., J. Klicic, D. Covini, D. D. Church, J. P. Shaw, K. Roulin, F. Burgat-Charvillon, D. Valognes, M. Camps, C. Chabert, et al. 2006. Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Med. Chem.* 49: 3857–3871.
43. Sadhu, C., B. Masinovsky, K. C. Dick, G. Sowell, and D. E. Staunton. 2003. Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J. Immunol.* 170: 2647–2654.
44. Herman, S. E., A. L. Gordon, A. J. Wagner, N. A. Heerema, W. Zhao, J. M. Flynn, J. Jones, L. Andritsos, K. D. Puri, B. J. Lannutti, et al. 2010. Phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in CLL by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* 116: 2078–2088.
45. Soond, D. R., E. Björge, K. Moltu, V. Q. Dale, D. T. Patton, K. M. Torgersen, F. Galleway, B. Twomey, J. Clark, J. S. Gaston, et al. 2010. PI3K p110δ regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* 115: 2203–2213.
46. Zhang, T. T., K. Okkenhaug, B. F. Nashed, K. D. Puri, Z. A. Knight, K. M. Shokat, B. Vanhaesebroeck, and A. J. Marshall. 2008. Genetic or pharmaceutical blockade of p110δ phosphoinositide 3-kinase enhances IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122: 811–819.
47. Xu, L., L. Zhang, Y. Yi, H. K. Kang, and S. K. Datta. 2004. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat. Med.* 10: 411–415.
48. Hsieh, H. L., C. B. Wu, C. C. Sun, C. H. Liao, Y. T. Lau, and C. M. Yang. 2006. Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 207: 757–766.
49. Crispín, J. C., M. Oukka, G. Bayliss, R. A. Cohen, C. A. Van Beek, I. E. Stillman, V. C. Kyttaris, Y. T. Juang, and G. C. Tsokos. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* 181: 8761–8766.

Agradecimientos:

Quiero agradecer al Instituto Carlos III el haberme concedido una beca FIS que me ha permitido el poder hacer la presente tesis doctoral y a mi directora de tesis, la doctora Ana Clara Carrera, la posibilidad de realizarla en su laboratorio. A Ana C y a mi codirector, el doctor Domingo F. Barber, les agradezco también las horas que me han dedicado en la guía de esta tesis y todo lo que he aprendido con ellos.

No puedo dejar de agradecer a las personas que me han ayudado a llegar hasta este laboratorio. Por una parte al doctor Segundo González que me permitió adentrarme en el mundo de la investigación acogiéndome en su laboratorio en la fase de estudiante. Al doctor, por aquella época aún predoc, compañero y amigo, Alejandro López Soto, gran investigador y mejor persona, del que aprendí entre otras cosas rigor y respeto por esta profesión. Al doctor Carlos López Otín, un ejemplo cuya referencia fue fundamental.

Una vez aquí, el día a día se ha hecho agradable, incluso cuando parecía imposible, gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio y departamento:

- Al laboratorio 412, Lidia, Mariana y especialmente a Cris por horas de discusión, birras, etc.

- Al club de las cañas de los Miércoles, Jueves y nuevamente Miércoles, porque no todo es ciencia y en ocasiones para que la ciencia fluya hace falta relajarse. Gracias a Pedro, por discusiones de todo tipo, siempre constructivas. A la pequeña, la joven y finalmente gran Araceli, una amiga. A Romeruca, la inocencia que pasito a pasito va haciendo grandes cosas. Y al resto de integrantes de este club abierto por el que ha pasado mucha gente, casi tanta como anécdotas ha generado, y espero que siga pasando.

- Al laboratorio 416, Bea, Borja, Dimi, el Rubio, Laura, Julia, etc, compinches en la organización de espichas a la madrileña.

- A David, ese *peaso* Sevillano fórmula uno en el lenguaje al que me costó dios y ayuda entender hablar, a Manu, Mai, María, Elena, Laura, Mirinda, porque siempre hay momento para una conversación y unas risas, gracias. Incluso a aquellos que no saben que me han ayudado.

- Al laboratorio 16 del CNBito, el del gran DF Barber, Isabela, Sonia, Rob (el peperoni), Teresa, Laura, Raquel, etc, por su ayuda, reactivos y charlas.

- A los compañeros de esas partidillas de volley playa, Mohi, JC, ...

- A Cathy y su infinita paciencia con mi inglés, Antonio por conseguir las cosas en tiempo record aunque no aparezcan en catálogo, a Coral que tanto me ha ayudado especialmente en la organización de los seminarios Junior.

- Mención especial para el doctor Julio Gutiérrez y la Doctora Rosa Varona, un ejemplo de como hay que hacer las cosas, planificación y rigor, con vosotros he aprendido muchísimo gracias a discusiones en las que solía perder pero con las que en realidad he ganado mucho. Y por supuesto para el doctor CARlos del Fresno, un crack y todo un ejemplo del que cada día aprendo algo nuevo, gracias por las discusiones, los consejos y la amistad.

Y a mi laboratorio, algunos ya han continuado su andanza, como el gran Amit, un muy buen amigo; Miriam, todo alegría; Susana, la jefa del pasillo; Chechu y su chechuchones, que lejos de ser un grupo de música es un elemento de mucho cuidado, siempre dispuesto a tomarse unas cañas y discutir cualquier experimento, muchas anécdotas a nuestras espaldas; o María, todo un ejemplo como persona y trabajadora. Otros siguen por aquí como Vir, una científica de los pies a la cabeza, la sinceridad en estado

puro y una amiga como pocas, nunca olvidaré que el Western Blot sigue el principio físico conocido como de Michael Jackson, va de negro a blanco. Anita, amiga, consejera y guía en este complicado mundo de la ciencia. A Javi, un grande siempre dispuesto a echarle una mano. Vicen de Sella, fenómeno donde los halla con un entusiasmo y ganas de hacer buena ciencia difíciles de igualar. Vero, Albert y Carmen, a los que les queda un largo recorrido pero que culminarán con éxito seguro en cualquiera de los proyectos que emprendan. A Carmen, Lorena y Cyntia nuestro cuerpo técnico por su labor. Y Ana C, jefa y compañera de comidas.

Al Departamento de Inmunología y Oncología, donantes *voluntarios*, gracias. Ha sido un placer hacer la tesis aquí.

Hay gente que hace trabajos que se desconocen y no se reconocen, pero que son fundamentales para el correcto funcionamiento de las cosas, gracias por ello a Jesús y a Fernando, que me han echado una mano siempre que han podido, a la guapísima Yolanda, que siempre te recibe con una sonrisa, a Carol y Juanjo, auténticos fenómenos en su profesión, y al *arreglatodo* Víctor.

Por supuesto a ese maestro en el animalario, Lucio, un fenómeno.

Podría seguir agradeciendo y agradeciendo a gente del centro como a Elvira, a esos waterpoleros (Manu, César, Kike...), a los squasheros, a Rosita, etc. pero no puedo hacer unos agradecimientos más largos que la tesis con lo cual tengo que ir cortando. El caso es que aunque: *Yo no vine aquí a hacer amigos*; el caso es que los he hecho.

A mis amigos en Asturias, por haberme apoyado y hacer, que a pesar de la distancia, cada vez que nos vemos sea como si hubiese sido ayer el último día. También gracias a los de fuera de Asturias, especialmente a Alex, el grande, y a Lucía T.

Esta tesis no habría sido posible sin mi familia, los que están y los que por desgracia ya no, gracias. A mi madre y a mi padre, por la educación que me han dado, por amueblarme de manera correcta la cabeza y por enseñarme la importancia del trabajo bien hecho y a intentar superarme día a día; a mis abuelos, que tantísimo me han apoyado en todos los sentidos y que también han contribuido a lo que soy hoy, a mis tíos y tías por haber creído siempre en mí; por supuesto al Piki, mi hermano, el cual me ha superado ya en todo y del que siempre aprendo, especialmente que no puedes parar de formarte porque los de atrás vienen pisando fuerte, gracias por estar siempre ahí, confiar y creer en mí, vas a ser un grande. Y a la familia de Pau, a Ana, esa guapísima rubia que se nos ha perdido por los Londres, a Tati-Isabel, Aníbal y Lu, personas increíbles, gracias por tratarme tan bien.

Por último, pero no menos importante, sino al contrario, gracias, mil gracias a ti, Pau. Gracias por las sonrisas, las lágrimas y el apoyo incondicional que siempre me has dado. Gracias por inspirarme y ser un ejemplo de cómo se deben hacer las cosas. Nunca sabré como demostrarte lo que me has ayudado.

Mil gracias a todos.



[illegible]



